

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**STUDIUM INTERAKCÍ DNA-VAZEBNÉ DOMÉNY PROTEINU
FOXO3 S NÍZKOMOLEKULÁRNÍMI LÁTKAMI**

STUDY OF INTERACTIONS BETWEEN THE FOXO3-DNA BINDING
DOMAIN AND SMALL-MOLECULAR COMPOUNDS

Diplomová práce

studijního oboru Biochemie

Vedoucí práce: RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.

Praha 2016

Vojtěch Dolejš

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitelky RNDr. Veroniky Obšilové, Ph.D. a že jsem všechny použité prameny řádně citoval. Tato práce nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne

.....

Podpis

Poděkování

Děkuji své školitelce RNDr. Veronice Obšilové, Ph.D. za trpělivé vedení práce v laboratoři, odborné rady a pomoc při vypracování této práce.

Dále děkuji RNDr. Zdeňku Tošnerovi, Ph.D. za provedení NMR experimentů a následnou pomoc se zpracováním naměřených dat a prof. RNDr. Tomáši Obšilovi, PhD za pomoc v laboratoři a vedení během některých experimentů.

Nakonec děkuji Mgr. Miroslavě Alblové Ph.D. a celému kolektivu pracovní skupiny Proteinových struktur na Fyziologickém ústavu AV ČR, v.v.i., zejména, za přátelské prostředí v laboratoři a ochotnou pomoc kdykoliv bylo potřeba.

Děkuji svým rodičům za poskytnuté zázemí a podporu.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je součástí projektu, jehož cílem je vývoj nízkomolekulárních látek schopných inhibovat interakci lidského transkripčního faktoru FOXO3 s DNA. Hlavním cílem této diplomové práce je charakterizace interakcí DNA-vazebné domény proteinu FOXO3 (FOXO3-DBD) s nízkomolekulární látkou S9, která inhibuje vazbu FOXO3-DBD na DNA pomocí různých biofyzikálních technik, jako je NMR, mikrotermoforéza a nativní elektroforéza.

Transkripční faktory FOXO jsou důležité a evolučně konzervované regulační proteiny, které se účastní mnoha důležitých buněčných dějů. Aktivita FOXO proteinů je regulována posttranslačními úpravami, z nichž nejdůležitější jsou fosforylace, acetylace a ubikvitinace. Forkhead transkripční faktory zastávají značný počet různých buněčných funkcí a účastní se mnoha buněčných signálních drah. Jejich exprese může probíhat tkáňově specificky. Obsahují asi 100 aminokyselin dlouhou DNA-vazebnou doménu složenou z několika částí. Mezi jejich funkce patří regulace buněčného cyklu a apoptózy, proliferace a diferenciací buněk, kontrola metabolismu a regulace protistresové odpovědi. U nádorových buněk lymfoblastomu je resistance vůči chemoterapii zprostředkována právě vysokou aktivitou transkripčního faktoru FOXO3. Z tohoto důvodu je nutné hledat způsoby, jak cíleně potlačit funkci tohoto proteinu.

Klíčová slova

FOXO3, exprese, purifikace, NMR, MST, EMSA

ABSTRACT

This diploma thesis is part of a project aiming for the development of low molecular compounds which would be capable to inhibit the interaction between human transcription factor FOXO3 and DNA. Main goal of this thesis is the characterization of the interaction between the low molecular inhibitor S9 and the DNA-binding domain of FOXO3 protein (FOXO3-DBD) by using variety of biophysical methods such as NMR, microscale thermophoresis and native electrophoresis.

FOXO transcription factors are important and evolutionary conserved regulatory proteins, which are involved in many crucial cellular processes. The activity of FOXO proteins is regulated by posttranslational modifications, out of which the most important are phosphorylation, acetylation and ubiquitination. Forkhead transcription factors participate in a variety of different cellular functions and are part of several signaling pathways. Its expression might be tissue specific. They contain approximately 100 amino acids long DNA-binding domain composed of several parts. Among its main functions belong the regulation of cell cycle and apoptosis, proliferation and cell differentiation, metabolism control and stress-response regulation. Tumor cells of lymphoblastome have developed resistance against chemotherapy by increasing activity of FOXO3 transcription factors. For this reason, it is necessary to look for specific means of suppression of the function of this protein.

This thesis is written in Czech.

Key words

FOXO3, exprese, purifikace, NMR, MST, EMSA

OBSAH

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Obsah.....	6
Seznam použitých zkratk.....	8
1 Přehled literatury.....	10
1.1 Transkripce a transkripční faktory.....	10
1.2 Forkhead transkripční faktory a podrodina FOXO.....	12
1.3 Fyziologická funkce FOXO a její regulace.....	13
1.4 Struktura FOXO a mechanismus účinku.....	16
1.5 FOXO jako součást buněčných signálních drah.....	18
1.6 Patologická funkce FOXO a její vliv na nádorová onemocnění.....	20
2 Cíle práce.....	22
3 Materiály a metody.....	23
3.1 Použitý materiál.....	23
3.1.1 Chemikálie.....	23
3.1.2 Přístroje.....	24
3.1.3 Laboratorní pomůcky.....	25
3.2 Příprava expresního konstruktu.....	26
3.2.1 Návrh a příprava.....	26
3.2.2 Příprava kompetentních buněk TOP 10.....	27
3.2.3 Horizontální agarosová elektroforéza.....	28
3.2.4 Příprava plasmidu.....	29
3.2.5 Příprava PCR produktu.....	32
3.2.6 Ligace a transformace do expresních buněk.....	33
3.2.7 Použité konstrukty.....	34
3.3 Exprese a purifikace FOXO3-DBD.....	35
3.3.1 Exprese proteinu.....	35
3.3.2 Lyze buněk.....	36
3.3.3 GST afinitní chromatografie.....	36
3.3.4 Niklová chelatační chromatografie.....	38
3.3.5 Stanovení koncentrace proteinu a odštěpení afinitní kotvy.....	39
3.3.6 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS.....	40
3.3.7 Kationtově výměnná chromatografie.....	42
3.3.8 Gelová permeační chromatografie.....	43

3.4	Nukleární magnetická rezonance.....	44
3.4.1	Příprava vzorků na NMR měření.....	44
3.4.2	Měření spekter FOXO3-DBD značené ^{15}N	46
3.4.3	Měření spekter FOXO3-DBD značené ^{15}N a ^{13}C	47
3.4.4	Vyhodnocení a sekvenční přiřazení.....	48
3.5	Mikrotermoforéza.....	49
3.6	Nativní elektroforéza.....	51
3.7	Molekulární dokování.....	54
4	Výsledky	55
4.1	Příprava expresního konstruktů.....	55
4.2	Purifikace různých konstruktů FOXO3-DBD.....	56
4.2.1	Expresní test konstruktů FOXO3-DBD (156-569) v pET15b.....	57
4.2.2	Purifikace FOXO3-DBD (156-269) v pGEX-6-P-1.....	57
4.2.3	Purifikace ^{15}N a ^{13}C značené FOXO3-DBD.....	59
4.3	Nukleární magnetická rezonance.....	61
4.3.1	HSQC spektrum FOXO3-DBD v přítomnosti inhibitoru S9.....	61
4.3.2	Sekvenční přiřazení aminokyselin za použití ^{15}N a ^{13}C značeného proteinu.....	62
4.4	Stanovení vazebné afinity FOXO3-DBD pro inhibitor S9 pomocí mikrotermoforézy.....	64
4.5	Ověření inhibice vazby FOXO3-DBD na DNA v přítomnosti inhibitoru S9 pomocí nativní elektroforézy.....	66
4.6	Vizualizace vazby inhibitoru S9 na DNA-vazebný povrch FOXO3-DBD pomocí molekulárního dokování.....	67
5	Diskuse	69
6	Závěr	71
7	Seznam citované literatury	72

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	adenin
Afx	gen (z angl. acute leukemia fusion gene located on chromosome X)
APS	peroxodisíran amonný (z angl. ammonium peroxodisulphate)
Bcl-6	protein (z angl. B-cell lymphoma protein 6)
Bim	protein (z angl. Bcl-2 (viz výše) interacting mediator)
BTG1	gen (z angl. B-cell translocation gene)
C	cytosin
CBB R250	Coomasie Brilliant Blue R250, modré barvivo
CDK	cyklin dependentní kinasa
DBD	DNA-vazebná doména (z angl. DNA-binding domain)
DDB	protein (z angl. Damage-specific DNA binding protein)
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
DTT	1,4-dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
EMSA	gelová zpomalovací analýza (z angl. electrophoretic mobility shift assay)
FasL	protein (z angl. fatty acid synthase (receptor) ligand)
FOXO	forkhead box O, O-podskupina forkhead transkripčních faktorů
FKH	forkhead doména
FKHR	protein (z angl. forkhead homolog in rhabdomyosarcoma)
FKHRL1	protein (z angl. FKHR-like protein 1 (viz výše))
FPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie (z angl. fast protein liquid chromatography)
G	guanin
GADD	protein (z angl. growth arrest and DNA damage protein)
GST	glutathion-S-transferasa
Hsp70	protein teplotního šoku 70 (z angl. heat shock protein 70)
HSQC	heteronukleární jednokvantová koherence (z angl. heteronuclear single-quantum coherence)
IGF-1	insulinu podobný růstový faktor (z angl. insulin-like growth factor)
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
JNK	kinasa (z angl. jun N-terminal kinase)
LB	živné médium (médium dle Luria-Bertaniho)
MDR1	protein (z angl. multidrug resistance protein 1)
Mllt7	gen (z angl. mixed-lineage leukemia Trithorax Homolog translocated to chromosome 7)
MnSOD	protein (z angl. manganese superoxid dismutase)
MOPS	3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina
MST	mikrotermoforéza (z angl. microscale thermophoresis)
MST1	kinasa (z angl. mammalian Ste20-like kinase 1)
NES	nukleární exportní sekvence
NLS	nukleární lokalizační signál
NMR	nukleární magnetická rezonance

PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (z angl. polyacrylamide gel electrophoresis)
PBS	fosfátový pufr (z angl. phosphate buffered saline)
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PKB/Akt	proteinkinasa B
PP	precission proteasa
PPAR γ	protein (z angl. peroxisome proliferator activated receptor)
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
RPM	otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)
SDS	dodecylsírán sodný, denaturační činidlo (z angl. sodium dodecylsulphate)
SGK	kinasa (z angl. serum- and glucocorticoid-inducible kinase)
SIRT	sirtuin (z angl. silent mating type information regulation 2 homolog)
T	thymin
TAD	transaktivační doména
TBE	TRIS-borát-EDTA pufr
TBF	pufr (z angl. transmit buffer full)
TEMED	N, N, N', N'-tetraethylendiamin
TRAIL	protein (z angl. tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand)
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	jednotka aktivity (z angl. unit)
v/v	objem/objem (z angl. volume/volume)
w/v	hmotnost/objem (z angl. weight/volume)

1 PŘEHLED LITERATURY

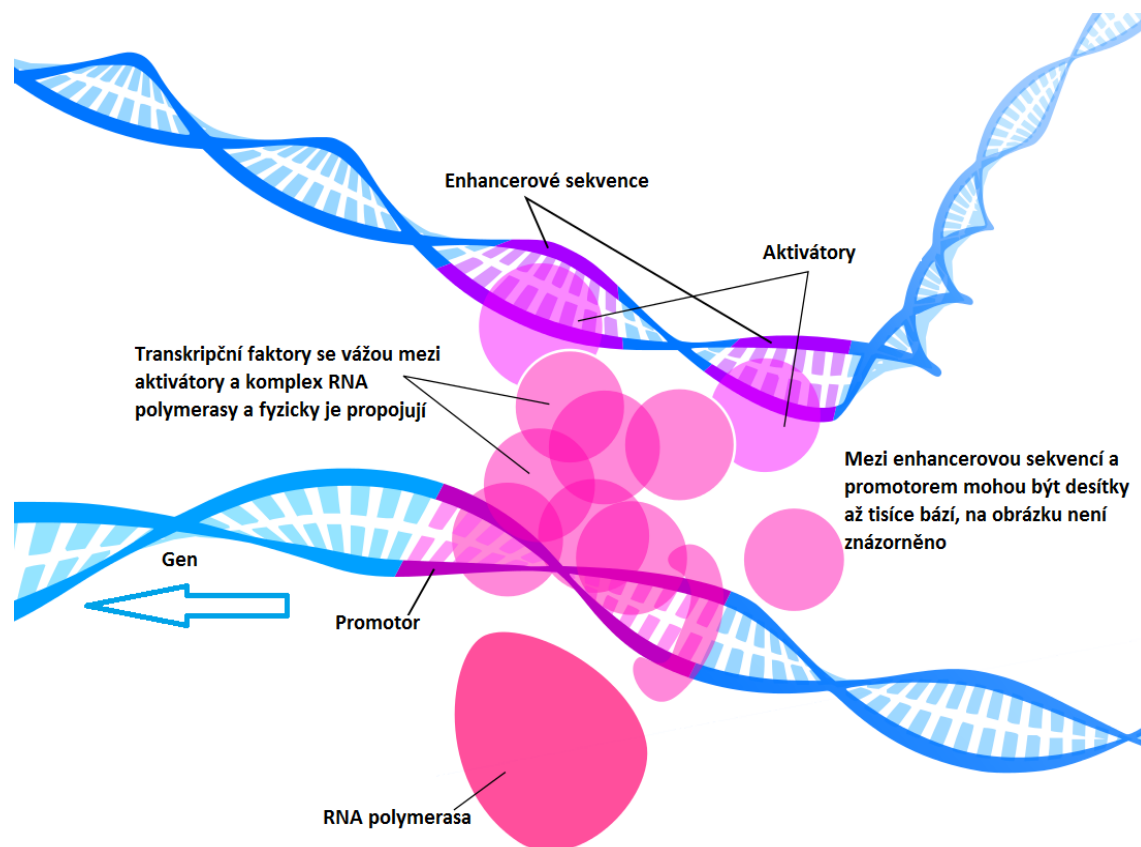
1.1 Transkripce a transkripční faktory

Transkripce je fyziologický děj umožňující aplikaci informace obsažené v molekulách DNA. Genetickou informaci je třeba doručit z buněčného jádra až k ribosomu, kde proběhne samotná translace, tedy překlad informace do formy proteinu. Tento přenos je umožněn molekulami mRNA (mediátorová RNA), které vznikají právě během transkripce. Mediátorová RNA nese informaci z jednoho genu a je tedy dostatečně malá, aby se dostala ven z buněčného jádra, na rozdíl od obrovských molekul DNA. Celému tomuto procesu, od počátku transkripce až po nově vyrobený protein, se říká genová exprese. Zásadní rozdíl mezi molekulami DNA a RNA je v cukerné složce každého nukleotidu. DNA obsahuje 2'-deoxyribosu, RNA ribosu. Existují ještě rozdíly v nukleových bázích, zejména záměna thyminu za uracil při transkripci z DNA do RNA, ovšem ty nejsou tak jednoznačné, protože existuje mnoho výjimek. Ribosom je riboproteinový komplex katalyzující tvorbu nového proteinu dle informace zapsané v mRNA. Celý tento proces musí být pečlivě regulován, aby nedocházelo k přetěžování buňky výrobou zbytečných proteinů.

Celá transkripce se dělí na tři základní části - iniciaci, elongaci a terminaci. Jednou z mnoha úrovní regulace je kontrola transkripce pomocí specifických proteinů, takzvaných transkripčních faktorů. Různé transkripční faktory ovlivňují různé fáze. Tyto proteiny mají DNA-vazebné domény rozpoznávající specifické sekvence na DNA. Po navázání na tyto sekvence dojde ke strukturní změně a rozpletení dvoušroubovice, což umožní nasednutí transkripčního aparátu a iniciaci celého procesu. Do tohoto aparátu patří zejména RNA polymerasa II, celá řada strukturních proteinů a další faktory. Elongační transkripční faktory udržují celý proteinový komplex nutný ke správné funkci pohromadě a v chodu. Eukaryotní transkripce je zařízena tak, aby se bez neustálé přítomnosti elongačních faktorů celý proces zastavil. Tento proces je znázorněn na obrázku 1.1 na straně 11.

Různé geny mohou mít různé regulační sekvence rozpoznávané různými transkripčními faktory. Některé transkripční faktory jsou vysoce specifické a kontrolují pouze jeden nebo několik málo genů. Jiné, jako například FOXO3, kontrolují celou řadu genů, která se obvykle účastní nějakého komplexnějšího biologického procesu.

DNA-vazebné domény a jimi rozpoznávané sekvence jsou velmi konzervované napříč všemi organismy^[1].



Obr. 1.1: Schematické znázornění eukaryotické transkripce. Vlastní gen začíná promotorovou sekvencí, na kterou nasedá komplex RNA polymerasy II. Ta rozpoznává specifickou sekvenci typickou pro promotor, takzvaný TATAbox (úsek DNA s velkým obsahem A a T). Vlastní navázání RNA polymerasy II na promotor ale ještě neznamena začátek transkripce. Eukaryotická RNA polymerasa II ke své funkci potřebuje kontakt s iniciačními a posléze elongačními transkripčními faktory, bez nichž se proces zastaví. Několik desítek až tisíců párů bází před promotorem mohou být takzvané enhancerové sekvence, na které se vážou transkripční aktivátory. Transkripční faktory pak vytvoří jakési přemostění mezi aktivátory a komplexem RNA polymerasy II a proces se nastartuje. DNA je v buněčném jádře uskladněna v silně komprimovaném stavu, nejde tedy o lineární útvar. Z tohoto důvodu jsou enhancerové sekvence v prostoru velmi blízko promotorovým, i když mezi nimi je mnoho bází a jsou velmi vzdálené v primární struktuře nukleové kyseliny. Obrázek přejat a upraven z PremedHQ^[2].

1.2 Forkhead transkripční faktory a podrodina FOXO

Transkripční faktory spadající do skupiny „Forkhead“ (přejato z angličtiny, nemá ustálený český název) jsou vzájemně podobné aktivátory transkripce. Tato skupina je podskupinou velké rodiny transkripčních faktorů zvané „winged-helix“ proteiny díky typické struktuře jejich DNA-vazebné domény. Jejich geny byly prvně identifikovány v organismu *Drosophila melanogaster*,^[3] odkud pochází také jejich název. Malformace embryí *D. melanogaster* při delecí některých genů z této skupiny vypadají, jakoby měly místo hlavy jakousi vidlici („forkhead“)^[4]. Postupně byly tyto geny, potažmo proteiny, identifikovány ve všech zkoumaných organismech, jak prokaryotních, tak eukaryotních. Čím složitější a evolučně pokročilejší organismus je, tím více má genů pro forkhead proteiny. Největší počet forkhead genů mají obratlovci. Nejenže vzrůstá počet genů, roste také i jejich exprese.

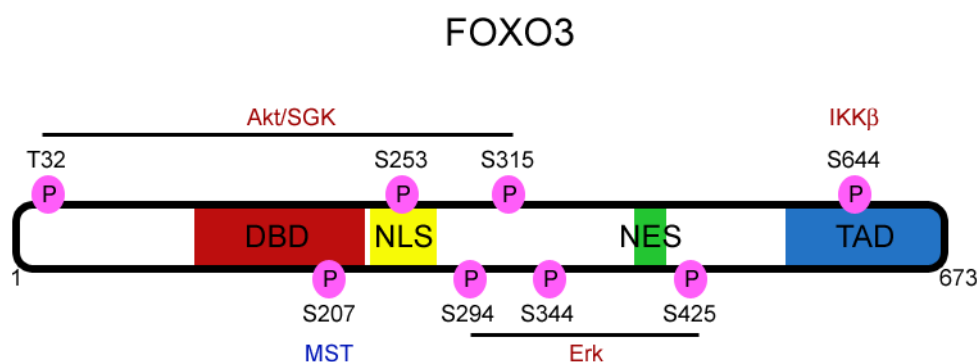
Forkhead transkripční faktory mají typický DNA vazebný motiv složený ze sekvence dlouhé přibližně 110 aminokyselin. Strukturně jde o evolučně konzervovanou kombinaci tří α -helixů H1, H2 a H3, tří β -skládaných listů S1, S2 a S3 a dvou flexibilních ohybů W1 a W2. Tyto flexibilní části, kterým se v angličtině říká wings (křídla), daly jméno celé této skupině transkripčních faktorů^[5].

Forkhead transkripční faktory se dále dělí do podrodin označených A - S. Do těchto skupin jsou jednotliví členové řazeni na základě jejich sekvenční homologie. Samotné názvy členů této rodiny jsou zkracovány na fox (forkhead box, rodina forkhead) a písmeno značící konkrétní podrodinu (například foxA). V této zkratce je také kódován původ tohoto proteinu. Pokud jsou všechna písmena velká (FOXA), jde o lidský protein. Pokud jsou všechna písmena malá, jde o myší protein (foxa). Pokud je první a poslední písmeno velké (FoxA), jde o protein náležící strunatci jinému než *H. sapiens* a *M. musculus*. Pokud jsou malá všechna písmena kromě posledního (foxA), jde o protein náležící jiné skupině živočichů^[6].

Podrodina O byla poprvé popsána při výzkumu chromozomálních zlomů u alveolárního rhabdomyosarkomu^[7]. Má čtyři hlavní členy - FOXO1 (FKHR), FOXO3 (FKHRL1), FOXO4 (Afx, Mlt7) a FOXO6. V závorce jsou uvedeny názvy používané před sjednocením nomenklatury. FOXO2 bylo sice popsáno, nicméně se ukázalo, že jde o jeden z dříve popsaných FOXO proteinů a nejde tedy o nový typ. FOXO5 bylo také

popsáno, ale pouze u jednoho jediného organismu (*Danio rerio*, zebřička), a proto se běžně neuvádí při výčtu proteinů této podrodiny^[8].

FOXO proteiny jsou složeny ze dvou domén a navíc nesou ve své primární struktuře dvě sekvence určující buněčnou lokalizaci, jak je zobrazeno na obrázku 1.2. Tyto sekvence jsou konzervované a mezi různými organismy se v podstatě neliší. Důležitá jsou také jednotlivá fosforylační místa, která jsou také konzervována. Celý protein je dlouhý přibližně 650 aminokyselin, výjimku tvoří FOXO4, které je kratší. Je tvořeno pouze přibližně 500 aminokyselinami^[9,10].



Obr 1.2: Schematická mapa proteinu FOXO3. Primární struktura FOXO3 obsahuje celkem osm fosforylačních míst, na obrázku označených růžovými kruhy s P. Nacházejí se zde tři fosforylační místa pro Akt kinasu (T32, S253 a S315), jedno místo pro MST kinasu (S207), tři místa pro Erk kinasu (S294, S344 a S425) a jedno místo pro IKK β kinasu (S644). DBD - DNA vazebná doména (DNA-binding domain), NLS - jaderný lokalizační sekvence (Nuclear localisation sequence), NES - jaderná exportní sekvence (Nuclear export sequence), TAD - transaktivační doména (Transactivation domain). Obrázek přejat z Wilson et al. ^[11].

1.3 Fyziologická funkce FOXO a její regulace

Fyziologická funkce těchto transkripčních faktorů je zejména regulační. Jako součást několika signálních drah^[12] se podílí v podstatě na všech důležitých buněčných dějích. Zejména jde o řízení buněčného cyklu^[12], proliferace a zárodečného vývoje^[13], některých imunitních procesů^[14], apoptosy^[15,16], odpovědi na oxidační stres^[17], buněčného stárnutí^[18], opravy DNA^[19] a částí buněčného metabolismu^[20]. Z tohoto důvodu hrají roli v nádorových procesech^[21], onemocnění cév^[22], neurodegenerativních chorobách^[23], dlouhověkosti^[24,25,26] a také například ovlivňují průběh *diabetes mellitus*^[27].

Funkce jednotlivých proteinů této podrodiny je obdobná, liší se v podstatě jen mírou exprese v jednotlivých tkáních. FOXO1 je exprimován nejvíce v bílé tukové

tkání, FOXO3 v játrech a srdci, FOXO4 v srdci a příčně pruhovaných svalech. Obecně jsou však tyto transkripční faktory exprimovány v celém organismu. FOXO6 je výjimkou, je exprimován pouze v centrální nervové soustavě^[28].

FOXO3 rozpoznává několik podobných sekvencí, zejména však konzervovanou sekvenci 5'-GTAAACAA-3' (vazebný element DBE - Daf16 family member binding element)^[29], která se obvykle nachází v enhancerové (posilovací, přejato z angličtiny) oblasti genu. Tato sekvence se objevuje v genomu vícekrát, než by odpovídalo počtu regulovaných genů. Předpokládá se, že zbylé sekvence fungují jako parkovací místa pro FOXO3, pokud je jeho koncentrace v jádře vysoká. Tato místa slouží k odstavení přebytečných FOXO3, které tu čekají na úpravu a transport ven z jádra. Prostorové uspořádání DNA umožňuje fyzické přiblížení enhancerové a promotorové sekvence. Ještě před navázáním samotného transkripčního faktoru je DNA ohnutá tak, aby tato dvě místa byla blízko v prostoru. Po navázání FOXO3 na enhancerovou oblast dojde k protein-proteinovým interakcím mezi FOXO3, dalšími transkripčními faktory a RNA polymerasou II. Samotné FOXO3 funguje jako iniciátor transkripce a může působit jak aktivačně, tak inhibičně. Aby se FOXO3 mohlo navázat na DNA, je třeba, aby předtím došlo k rozvolnění chromatinu. Není jasné, zda je FOXO3 samo o sobě schopno aktivovat rozvolňování (pomocí H3K4me1 a H3K27ac transferas), nebo jestli funguje až tehdy, kdy je chromatin rozvolněn jinými mechanismy^[30].

Hlavní funkcí FOXO3 je ochrana buněk proti oxidačnímu stresu a homeostáze redoxního stavu cytoplasmy. Jeden z cílových genů FOXO3 je i manganová superoxid dismutasa, jedna z hlavních složek buněčné ochrany před kyslíkovými radikály. Zároveň bylo popsáno i snížení hladiny aktivní formy FOXO3 ve stárnoucích buňkách a buňkách vystavených stresu. Naopak v těchto buňkách byla zvýšená hladina Akt kinasy, která FOXO3 fosforyluje a deaktivuje^[19]. V tabulce 1.1 na straně 15 je ukázáno několik vybraných proteinů, jejichž exprese je řízena FOXO transkripčními faktory.

Tabulka 1.1: Výběr proteinů, jejichž transkripce je přímo ovládána FOXO^[8]

zkratka proteinu	funkce
p27 ^{Kip1} , p21 ^{Cip1} , cyklin G2, p130, GADD45	buněčný cyklus
GADD153, Fas L, Bim, Bcl-6, Hsp70, DDB, TRAIL	přežití a apoptosa
Katalasa, MnSOD, PA26	detoxikace
BTG1, Id	diferenciace
Glc-6-fosfatasa, PPAR γ , fosfoenolpyruvát karboxykinasa, IGF binding protein	metabolismus
caveolin-1	fagocytosa

Funkce FOXO transkripčních faktorů je regulována zejména změnami v buněčné lokalizaci. FOXO je regulováno proteinkinasou B, několika růstovými faktory a stresem indukovanými kinasami. Pomocí několika typů posttranslačních úprav jsou FOXO proteiny adresovány do buněčného jádra nebo do cytoplasmy. V cytoplasmě existuje zásoba FOXO proteinů, které jsou v neaktivní formě. Buňka tímto způsobem zamezuje přílišnému plýtvání, ke kterému by docházelo, pokud by nepoužívané proteiny byly ihned ničeny.

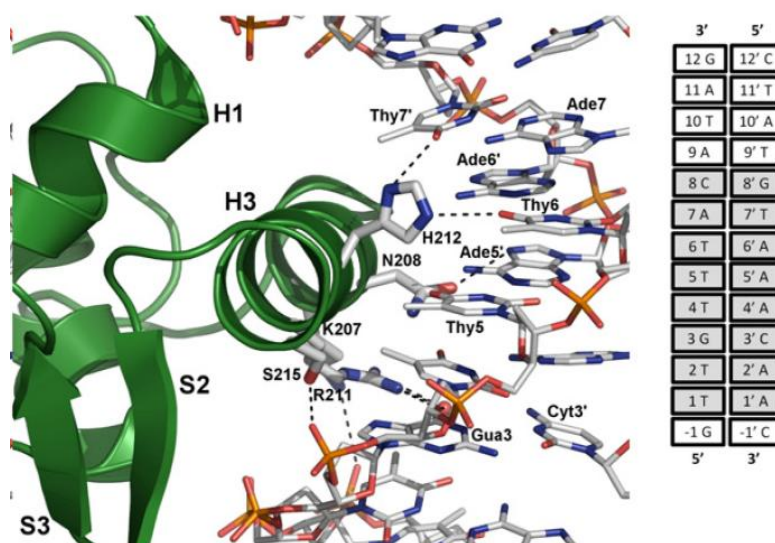
Důležité úpravy, kterým podléhá FOXO3, jsou fosforylace, ubikvitinace a acetylace^[9]. K těmto úpravám dochází v rámci signálních drah popsanych na obrázcích 1.5 a 1.6 (strana 18 a 19). Část FOXO3 je v jádře a vykonává svou funkci. Pokud je nutné zastavit transkripci zprostředkovanou FOXO3 proteiny, jsou fosforylovány. K fosforylaci dochází pomocí Akt nebo SGK kinas na Thr32 a Ser253. Tato fosforylace zavede na povrch proteinu negativní náboj, který vyústí v konformační změnu. Takto pozměněný protein je rozpoznáván regulačním proteinem 14-3-3 a v komplexu s ním je exportován z jádra ven^[10]. Pro vytvoření komplexu je třeba na jednu molekulu FOXO3 dvě molekuly proteinu 14-3-3^[32]. Proteiny 14-3-3 jsou hojně rozšířené regulační proteiny vážící mnoho různých interakčních partnerů. Aby nedošlo k okamžitému návratu FOXO3 do jádra, vazba proteinu 14-3-3 překrývá sekvenci jaderného lokalizačního signálu. Zároveň je odhalena jaderná exportní sekvence. Dokud je FOXO3 v komplexu s proteinem 14-3-3, komplex obou proteinů zůstává v cytoplasmě a není aktivní^[33].

Ke zpětné aktivaci FOXO3 dochází pomocí tří možných cest. Jednou z nich je defosforylace pomocí fosfatasy, tento proces však není detailně prozkoumán. Druhou z cest je fosforylace Ser207 pomocí stresem aktivované kinasy MST1. Tento fosfát rozruší vazbu mezi FOXO3 a proteinem 14-3-3. Jakmile je transkripční faktor FOXO3 volný, je ihned translokován do jádra. Třetí cestou je fosforylace Thr447 na povrchu proteinu 14-3-3 pomocí stresem aktivované JNK kinasy. Zavedení fosfátu stejně jako v minulém případě rozruší vazbu mezi oběma proteiny v komplexu a FOXO3 se tím uvolní. K adresování FOXO3 do jádra dochází pomocí nukleární lokalizační sekvence^[34].

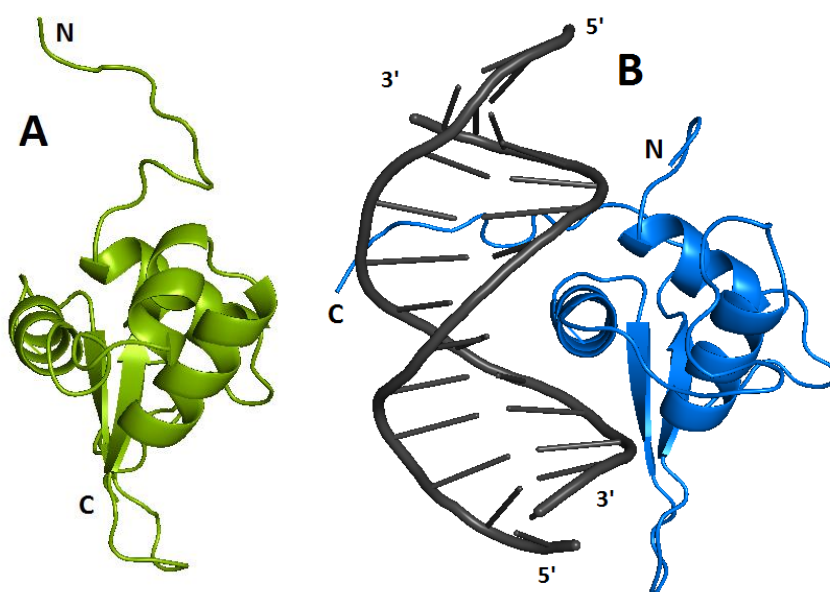
Acetylace a ubikvitinace hrají vedlejší roli. Monoubikvitinace FOXO3 slouží jako signál pro transport do jádra a je aktivována stresem. Acetylace FOXO3 umožňuje pohyb v jádře. Takto upravený protein je cíleně přesouván do oblastí jádra s vysokou koncentrací genů, které reguluje. Detaily tohoto procesu nejsou příliš prozkoumány^[35].

1.4 Struktura FOXO a mechanismus účinku

V současné době jsou známy struktury FOXO1, FOXO3 a FOXO4 vyřešené pomocí rentgenové krystalografie a nukleární magnetické rezonance. Na základě těchto dat byl navržen mechanismus vazby DNA. Vizualizace je na obrázku 1.4 (str. 17). 110 aminokyselin dlouhá DNA-vazebná doména FOXO3 interaguje s DNA zejména pomocí helixu H3, který se vkládá do velkého žlábků. Mezi touto doménou a nukleovou kyselinou vzniká 15 vodíkových vazeb a 5 van der Waalsovských kontaktů. Většina těchto vazeb a kontaktů probíhá v místě rozpoznávané specifické sekvence 5'-GTAAACAA-3', ale ne všechny. Zejména vodíkové vazby jsou tvořeny spíše s fosfátovou kosterou nukleové kyseliny než s bázemi samotnými. Hlavními interakčními aminokyselinami helixu H3 jsou Asn208, Arg211, His212 a Ser215, viz obrázek 1.3 na straně 17. Pomocí mutačních studií bylo také ukázáno, že se na vazbě proteinu na DNA podílí ohyb W1 a C-konec proteinu. Ohyb W1 nespecificky interaguje elektrostaticky s fosfátovou kosterou. C-koncový úsek pak napomáhá helixu H3 vazbě do velkého žlabu^[9,30]. Na základě těchto strukturních dat bylo pomocí molekulární modelování navrženo několik možných inhibitorů, z nichž některé byly zkoumány v této práci.



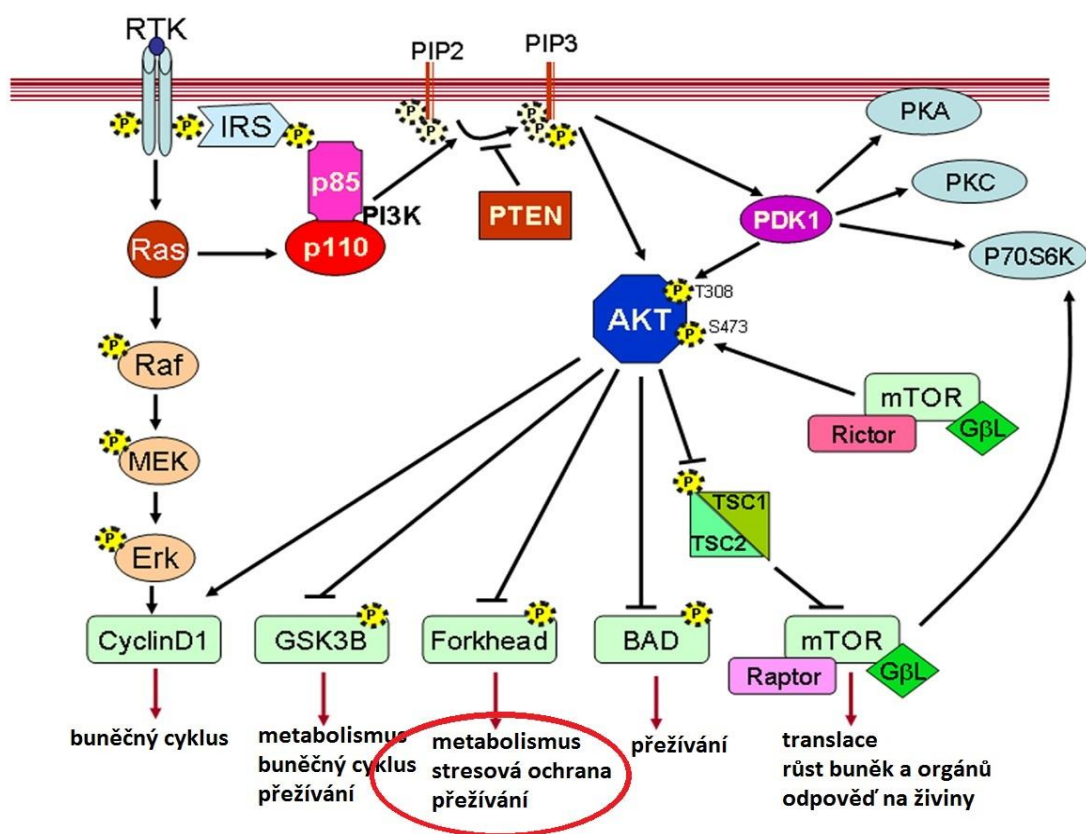
Obr. 1.3: Vizualizace interakce helixu H3 z DNA-vazebného povrchu FOXO3 s DNA rozpoznávací sekvencí. Označené aminokyseliny a báze se přímo účastní vazby helixu H3 z FOXO3 na sekvenci 5'-GTAAACA-3' z DBE motivu. Přerušovanou čarou jsou zvýrazněny vodíkové můstky, oranžové jsou zvýrazněné fosfátové skupiny. Obrázek přejatý a upravený z Obsil et al.^[30].



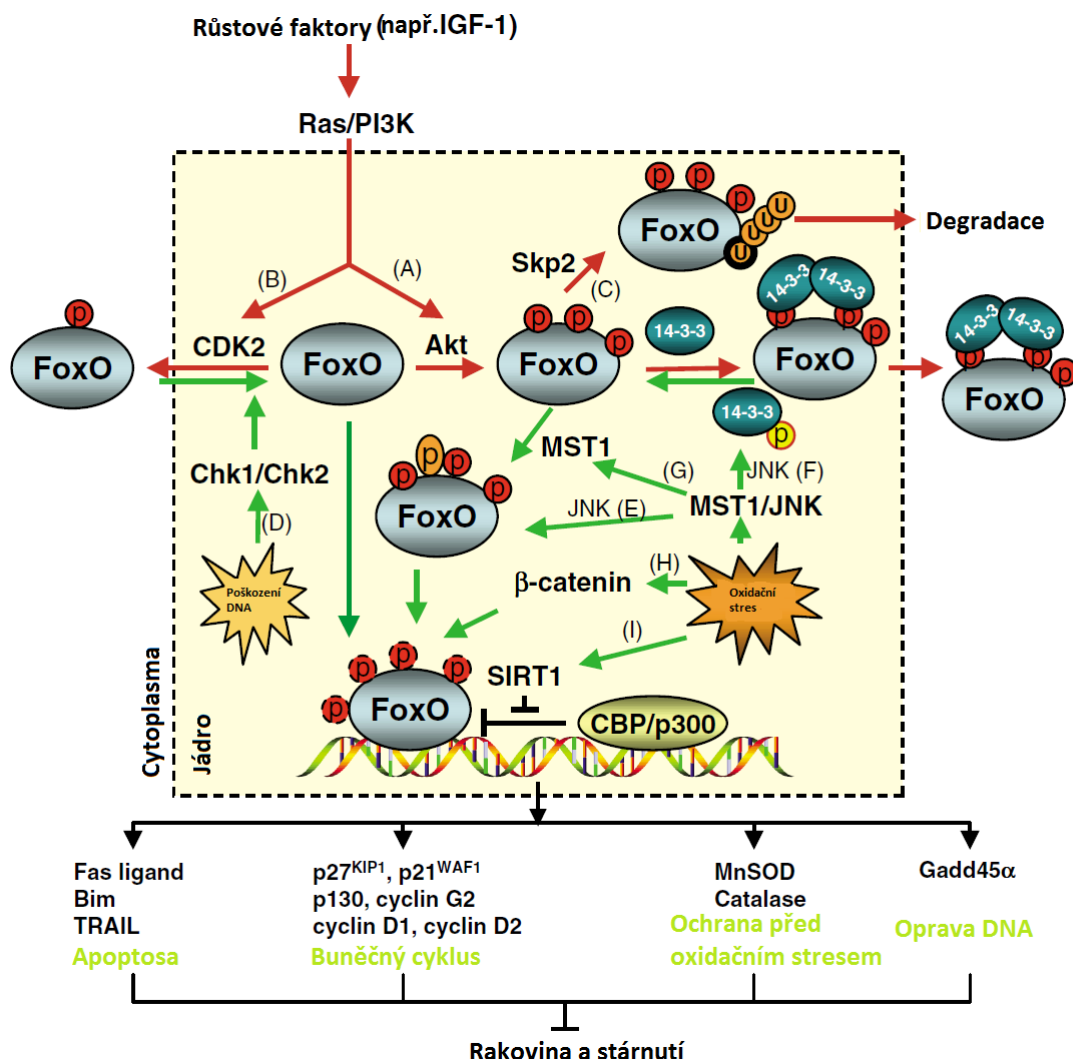
Obr 1.4: Vyřešené struktury FOXO3-DBD. Vlevo je struktura vyřešená pomocí NMR spektroskopie (A), vpravo pomocí rentgenové krystalografie(B). Data byla získána z databáze PDB^[36], kde jsou zobrazené struktury uloženy pod kódem 2UZK (krystalová), respektive 2K86 (NMR). Struktury jsou vizualizovány pomocí programu "PyMOL"^[37].

1.5 FOXO jako součást buněčných signálních drah

FOXO náleží signální dráze navazující na inzulinové a jim podobné (insulin-like) receptory. Tato dráha je obvykle nazývána podle fosfatidylinositol-3-kinasy (PI3K) nebo jejího alternativního názvu Akt. Funkcí této dráhy je řízení základních buněčných pochodů, jako je transkripce, translace, růst, proliferace a přežívání^[38]. Pokud dojde k deregulaci a poškození této dráhy, vede to k vážným onemocněním jako například nádorové bujení nebo autoimunitní onemocnění. Roli hraje také v rozvoji *diabetes mellitus*^[39]. Nádorové onemocnění vzniká tehdy, když se naruší rovnováha mezi růstem buněk a apoptosou. Pokud z nějakého důvodu dochází ke kontinuální aktivaci této signální dráhy, růst převáží a buňka se stává nádorovou^[40]. Vybrané části signálních drah, kterých se FOXO3 účastní, jsou zobrazeny na obrázcích 1.5 a 1.6 (strana 19).



Obr. 1.5: Signální dráha Akt kinasy. Na obrázku jsou pro zjednodušení nakresleny jen některé části signální dráhy. Červený ovál zvýrazňuje forkhead transkripční faktory, mezi které patří i FOXO. Tato dráha řídí hlavně růst a vývoj buněk, stresovou odpověď a metabolismus glukosy. Obrázek převzat a upraven z Carnero et al.^[41].



Obr. 1.6: Detailní pohled na funkci FOXO v buněčném jádře. (A) Kontakt buněk s inzulinem nebo růstovými faktory vede k aktivaci Akt signální dráhy a fosforylaci FOXO. To vede k vytvoření komplexu s proteinem 14-3-3 a transportu z jádra, tedy k ukončení transkripční aktivity. (B) Fosforylace FOXO pomocí cyklin-dependentní kinasy CDK2 vede také k transportu z jádra, ale tentokrát bez účasti proteinu 14-3-3. (C) Paralelně může být takto fosforylované FOXO polyubikvitinováno a po transportu z jádra degradováno. Dále jsou zde znázorněny dráhy vedoucí k aktivaci transkripční aktivity FOXO - (D) poškození DNA a (E-F) oxidační stres a jím aktivované kinasy. Kinasy buď fosforylují FOXO nepřímou (JNK (E)), zároveň fosforyluje i protein 14-3-3 (F)) nebo přímo (MST1 (G)). Oxidační stres také posiluje interakci FOXO s β-cateninem a zvyšuje jeho aktivitu (H). Zároveň také dochází k aktivaci histondeacetylasy SIRT1 (I), která deacetyluje FOXO a tím také zvyšuje jeho aktivitu. Obrázek přejat a upraven z Huang et al.^[42].

1.6 Patologická funkce FOXO a její vliv na nádorová onemocnění

Ačkoliv byly FOXO proteiny poprvé popsány jako proteiny bránící nádorovému bujení, postupem času se začala hromadit data poukazující v některých případech na přesně opačnou funkci těchto proteinů. Zejména to platí pro FOXO3, u kterého bylo prokázáno, že ochraňuje některé nádorové buňky před oxidačním stresem a tím zhoršuje průběh léčby^[18]. Tato ochrana spočívá v autopotenciaci PKB/Akt signální dráhy, ke které dochází při jejím narušení. Důsledkem je stálá aktivní signalizace, která vede ke zvýšené expresi složek systému ochrany před oxidačním stresem. Navíc FOXO3 indukuje expresi MDR1 proteinu, který transportuje chemoterapeutika z buňky ven a tlumí signální dráhu, která za normálních okolností při hypoxii spouští apoptosu^[33]. V poslední době bylo zjištěno, že FOXO3 podporuje metastázování nádorových buněk do okolních tkání, protože indukuje expresi metaloproteas štěpících mezibuněčnou matrix^[43]. A protože jde o protein udržující zdravé buňky při životě, drží při životě i buňky rakovinné. Hraje například významnou roli v udržování nádorových kmenových buněk chronické myeloidní leukémie^[44].

Hlavním důvodem studia role FOXO3 v nádorových procesech však je neuroblastom^[45]. Tento typ nádoru odvozeného od sympatického periferního nervstva je nejčastějším typem rakoviny u dětí, zejména novorozenců a batolat^[46]. Zároveň má neuroblastom nejvyšší úmrtnost ze všech typů rakovin postihujících děti v tomto věku. Za 13% dětských úmrtí v důsledku nádorového onemocnění může právě neuroblastom^[47]. Většina novorozenců do jednoho roku věku dokáže tuto nemoc překonat bez jakékoliv podpůrné léčby a bez následků na zdraví. Horší prognózu mají batolata starší než jeden rok. Pokud u nich dojde k metastázování, nádor se stává velmi odolným vůči běžně dostupné chemoterapii a prognóza těchto pacientů je velmi špatná^[48]. Příčina vzniku tohoto onemocnění není přesně známa, některé mutace a mechanismy doprovázející její průběh však byly popsány. Mezi ně patří i fakt, že klíčová signální dráha, jejíž špatná funkce vede ke vzniku a propagaci tohoto typu onemocnění je PI3K/Akt^[49]. Poškození funkce této dráhy vede k zhoršení prognózy pacientů s neuroblastomem z důvodu zvýšené odolnosti nádoru vůči chemoterapii^[50,51].

V případě neuroblastomu má FOXO3 dvě vzájemně opačné funkce. Buď funguje správně a indukuje apoptosu, čímž efektivně ničí nádorové buňky. Anebo funguje jako ochránce před oxidačním stresem a chemoterapeutiky. Tedy pokud

aktivace tohoto proteinu nevede ke smrti buněk, funguje přesně naopak, než je jeho účel a nádorovému onemocnění naopak pomáhá v růstu. V tomto případě zvyšuje rezistenci nádoru před léčbou a zhoršuje průběh nemoci. U tohoto typu rakoviny koreluje jaderná koncentrace FOXO3 s rizikovostí nemoci. U pacientů s rizikovým průběhem nemoci dochází k úmrtí až v 50% případů^[52].

2 CÍLE PRÁCE

- 1.) Exprese a purifikace ^{15}N a $^{15}\text{N}+^{13}\text{C}$ značeného proteinu FOXO3-DBD a příprava vzorků pro NMR měření.
- 2.) Identifikace aminokyselinových zbytků FOXO3, které jsou odpovědné za vazbu inhibitoru S9.
- 3.) Změření fyzikálně chemických parametrů interakce mezi DNA-vazebnou doménou FOXO3 a inhibitorem S9 za použití nukleární magnetické rezonance a mikrotermoforézy.
- 4.) Prozkoumání vlastní inhibice vazby proteinu FOXO3-DBD na DNA v přítomnosti inhibitoru S9 pomocí nativní elektroforézy.

3 MATERIÁLY A METODY

3.1 Použitý materiál

3.1.1 Chemikálie

Následující seznam chemikálií je seřazen abecedně, je uvedeno jméno výrobce.

β-merkaptoethanol	Carl Roth
ampicilin	Sigma-Aldrich
azid sodný	Sigma-Aldrich
bromfenolová modř	Sigma-Aldrich
citrát sodný	PENTA
Coomassie Brilliant Blue R 250, CBB R250	Sigma-Aldrich
dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného	PENTA
dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného	PENTA
dihydrogenfosforečnan draselný	PENTA
dimethylsulfoxid, DMSO	Carl Roth
1,4-dithiothreitol, DTT	Carl Roth
dodecylsulfát sodný, SDS	Sigma-Aldrich
dusičnan stříbrný	Chemapol
ethanol	PENTA
ethylendiamintetraoctová kyselina, EDTA	Carl Roth
fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth
formaldehyd	LACH:NER
GelRED	Biotium
glukosa	PENTA
glutathion	Sigma-Aldrich
glycerol	LACH:NER
hydroxid draselný	LACH:NER
hydroxid sodný	LACH:NER
chlorid amonný	PENTA
chlorid draselný	LACH:NER
chlorid manganatý	PENTA
chlorid rubidný	Sigma-Aldrich
chlorid sodný	LACH:NER
chlorid vápenatý	LACH:NER
imidazol	Carl Roth
inhibitory S9	získány od Dr. Ausserlechnera
isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid, IPTG	Sigma-Aldrich
isopropanol	PENTA
kyselina boritá	PENTA
kyselina dusičná	LACH:NER

kyselina chlorovodíková	LACH:NER
kyselina octová	LACH:NER
lysozym	Carl Roth
methanol	PENTA
médium Luria-Bertani, LB	Carl Roth
3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina, MOPS	Carl Roth
N, N, N', N'-tetraethylendiamin, TEMED	Carl Roth
octan draselný	PENTA
persulfát amonný	Sigma-Aldrich
Prescission proteasa	vyrobena Dr. Obšilovou
Primery	Sigma-Aldrich
Protease Inhibitor Cocktail Tablet, EDTA-Free	Sigma-Aldrich
Rotiphorese Gel 30, směs akrylamidu a bisakrylamidu 37,5:1	Carl Roth
síran hořečnatý	LACH:NER
síran nikelnatý	PENTA
SYPRO orange	Sigma-Aldrich
těžká voda, D ₂ O	Sigma-Aldrich
thiamin-hydrochlorid	Carl Roth
thiosíran sodný	LACH:NER
tris(hydroxymethyl)aminomethan, TRIS	Carl Roth
uhličitan vápenatý	PENTA

3.1.2 Přístroje

analytické váhy EG420-3NM	KERN
centrifuga 5804R	Eppendorf
centrifuga Z323K	HERMLE
	labortechnik
centrifuga Sigma 8K	Sigma-Aldrich
centrifuga 5415D	Eppendorf
FPLC Frac-900 a INV-907	Amersham
	Biosciences
inkubátor HT Multitron	Infors
inkubátor HandyLAB system	N-BIOTEK
magnetické míchačky VARIOMAG MAXI	Thermo Scientific
mrazák (-80 ° C)	Sanyo
spektrofotometr NanoDrop 1000	Thermo Scientific
NMR spektrometr Avance III	Bruker
PCR cykler Mastercycler personal	Eppendorf
peristaltická pumpa Ecoline	Ismatec
pH metr JENWAY 3505	P-LAB
Lightcycler 480 II	Roche
sada na akrylamidovou elektroforézu	BioRad

sada na agarovou elektroforézu	Sigma-Aldrich
sonikátor Sonicator3000 Misonix	Cole-Parmer
spektrofotometr Agilent 8453	Agilent Technologies
termoforéza	NanoTemper
vortex Zx3	Velp Scientifica
vortex Vortex-GENIE2	Scientific Industries
zdroj napětí na elektroforézu	BioRad

3.1.3 Laboratorní pomůcky

96 jamkové destičky	Roche
automatické pipety	Eppendorf
centrifugační kyvety	Carl Roth
Color Burst standard na SDS-PAGE	BioRad
Chelating Sepharose Fast Flow	GE Healthcare
glutathion sefarosa	Amersham
	Biosciences
dialyzační membrána	Carl Roth
filtry SPARTAN13/0,45 RC	Whatman
kapiláry pro termoforézu	NanoTemper
kolona na afinitní chromatografii	BioRad
kolona Superdex 75 (10/300GL)	Amersham
	Biosciences
koncentrátory Amicon Ultra	Millipore
křemenné kyvety	Agilent Technologies
laboratorní sklo	Simax
mikrozkumavky	P-LAB
nylonové filtry	Whatman
RedTAG kit	Sigma-Aldrich
SP sepharose	Amersham
	Biosciences
stříkačky	B. Braun
špičky	Axygen
kit na purifikaci plasmidu	Sigma-Aldrich
kit na purifikaci PCR produktu	Sigma-Aldrich
standard na agarosovou elektroforézu 1kb DNA ladder	Sigma-Aldrich
standard na PAGE	BioRad

3.2 Příprava expresního konstruktů

3.2.1 Návrh a příprava

Tato práce přímo navazuje na experimentální část méj bakalářské práce (Příprava DNA-vazebné domény forkhead transkripčního faktoru FOXO3). Interpretací NMR spekter změřených v rámci zmíněné bakalářské práce bylo zjištěno, že jedna z aminokyselin vážících se na inhibitor S9 byl histidin z histidinové kotvy a jde tedy o artefakt. Bylo tedy potřeba vytvořit nový konstrukt, který by tuto histidinovou kotvu neměl. Nejdříve bylo nutné teoreticky připravit celý proces přípravy expresního konstruktů pomocí několika bioinformatických databází volně dostupných na internetu.

Z databáze UniProt byla získána nukleotidová sekvence FOXO3-DBD a pomocí nástroje Expasy byla přeložena do sekvence aminokyselin. Dále bylo důležité zjistit, jaké restrikční endonukleasy jsou vhodné ke štěpení plasmidu při vkládání insertu. Nejen, že daný plasmid musí obsahovat restrikční místa, která tyto enzymy specificky rozpoznávají, ale zároveň je insert nesmí obsahovat jinde než na koncích. Pomocí nástroje NEBcutter bylo možné určit, zda v sekvenci DNA existují místa pro určené nukleasy. Zároveň bylo také nutné zjistit, zda je možné použít obě nukleasy ve stejném pufru. Je důležité, aby obě měly v používaných pufrech podobnou aktivitu, jinak dojde k nerovnoměrnému štěpení jednotlivých míst a sníží se výtěžek celého procesu.

Ve chvíli, kdy byly zvoleny tyto parametry, je třeba navrhnout oligonukleotidy. Tyto oligonukleotidy (primery, přejato z angličtiny) jsou krátké úseky DNA komplementární ke koncům sekvence, která je vkládána do plasmidu. Na zvýšení počtu molekul vkládané sekvence (dále insertu) se používá polymerasová řetězová reakce (dále PCR), která ke svému průběhu oligonukleotidy potřebuje. Reakční směs pro PCR obsahuje kromě oligonukleotidů a množené sekvence DNA také zdroj nukleotidů a enzymatický aparát, který cyklicky geometrickou řadou replikuje DNA. Součástí tohoto aparátu je i DNA polymerasa, která ovšem k započetí polymerace potřebuje oligonukleotidovou vláknovou DNA, na kterou nasedá. Pomocí oligonukleotidů, které jsou spolu s replikovaným úsekem DNA množeny, se určují jeho okraje. Toto je důležité zejména proto, že restrikční endonukleasy používané v dalších krocích reakce potřebují na správné nasednutí různě dlouhé nespecifické úseky DNA před samotným specifickým restrikčním místem. Oligonukleotidy by měly být přibližně stejné délky a s přibližně stejným poměrem purinových a pyrimidinových bází, aby měly co

nejpodobnější teplotu tání. Mají-li příliš rozdílnou teplotu tání, bude PCR probíhat méně efektivně. Navržené oligonukleotidy (tabulka 3.1) musí dodržovat čtecí rámec samotného kódovaného genu a také mohou zanést do sekvence stop kodon. Dalším krokem byla příprava vektoru pET15b s genem pro FOXO3-DBD (156-269).

Tabulka 3.1: Nukleotidová sekvence použitých oligonukleotidů pro přípravu expresních konstruktů FOXO3-DBD (156-269)

plasmid	pET15b
forwardní	5'-GCGCGGCAGCCATATGGCCTGGGGCAACCTGTCGTATGCAGA-3'
reversní	5'-GTTAGCAGCCGGATCCTCACTTTGCGGCACGGCCACGGGATT-3'

3.2.2 Příprava kompetentních buněk TOP10

Plasmidová DNA je amplifikována v buňkách TOP10, což je pro tyto účely upravený kmen bakterií *E. coli*. Tyto buňky jsou stejně jako ty expresní skladovány v glycerolové konzervě v -80 °C, která se připravuje dle následujícího protokolu:

- 1) 10 µl buněčné kultury z glycerolové konzervy pipetovat do 5 ml LB média s vhodným antibiotikem (v tomto případě streptomycin, 100 µg/ml) a nechat přes noc inkubovat za stálého třepání (37 °C, 200RPM)
- 2) narostlou kulturu zředit LB médiem o stejné koncentraci antibiotika v poměru 1:100 a přidat 10 ml 200 mM MgSO₄
- 3) nechat narůst kulturu v inkubátoru (37 °C, 200RPM) do optické density při 600 nm rovné přibližně 0,6 a poté centrifugovat (4 °C, 4000×g, 8 min, po 50 ml)
- 4) supernatant vylít a peletu resuspendovat v 19 ml pufru TBFI (tabulka 3.2) a 1 ml 1M MnCl₂
- 5) 5 min inkubovat na ledu a znovu za stejných podmínek centrifugovat
- 6) supernatant vylít a peletu resuspendovat ve 2 ml pufru TBFII (tabulka 3.3, strana 28), inkubovat na ledu 1 h
- 7) ve sterilním prostředí pipetovat do mikrozkušavek po 100 µl a prudce zmrazit v tekutém dusíku, uchovávat v -80 °C

Tabulka 3.2:

TBFI pufr	250 ml
glycerol, 15% (w/v)	37,5 g
CH ₃ COOK, 30mM	0,735 g
RbCl, 100mM	3,023 g
CaCl ₂ , 100mM	0,368 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O, 50mM	12,5 ml 1M
doplnit deionizovanou vodou na 250 ml	

Tabulka 3.3:

TBFII pufr	50 ml
glycerol, 15% (w/v)	7,5 g
MOPS, 10mM	0,55 g
RbCl, 10mM	0,06 g
CaCl ₂ , 75mM	0,55 g
doplnit deionizovanou vodou na 50 ml	

3.2.3 Horizontální agarosová elektroforéza

Horizontální agarosová elektroforéza je relativní metoda vizualizace nukleových kyselin. Principem je dělení nukleových kyselin pomocí elektrického napětí a agarového gelu. Nukleové kyseliny jsou v roztocích s pH blízkým fyziologickému přirozeně záporně nabitě díky fosfátovým skupinám v páteři makromolekul. To umožňuje jejich pohyb v elektrickém poli. Zároveň velikost negativního náboje přímo závisí na velikosti molekuly, neboť fosfátové skupiny se pravidelně opakují. Agarový gel pohyb molekul brzdí podle toho, jak moc jsou velké a způsobuje tedy jejich efektivní rozdělení při putování skrz. Rychlost putování molekul tedy závisí hlavně na jejich velikosti, ale je také ovlivněna velikostí elektrického napětí a iontovou silou používaného pufru.

Pro dělení nukleových kyselin o délce několika tisíc nukleotidů se používá 1% (w/v) agarosa (tabulka 3.4, strana 29). Zahřátím nad 90 °C se agarosa rozpouští v pufru a pozvolným ochlazováním vzniká pospojováním molekul vodíkovými můstky gel. Do horkého roztoku agarosy se rovněž přidává barva, která nějakým způsobem umožňuje následnou vizualizaci nukleových kyselin (např. zde použitá barva GelRED). Protože se jedná o relativní metodu, je potřeba použít standard o známých molekulových hmotnostech, dle kterého se pak vzorky porovnávají. V této práci byl používán standard 1kb DNA ladder od Sigma-Aldrich a elektroforéza probíhala vždy v pufru TBE (tabulka 3.5, strana 29). Vzorky jsou nanášeny na gel do připravených jamek spolu s dávkou barviva. Samotná elektroforéza probíhá tak dlouho, jak velké úseky nukleových kyselin se rozdělují. Gely barvené pomocí GelRED jsou vizualizovány pomocí UV lampy, protože tato barva při ozáření UV zářením oranžově fluoreskuje. Podle intenzity fluorescence je možné i přibližně určit množství nukleové kyseliny přítomné na gelu.

Tabulka 3.4:

Agarosový gel, 1%

Agarosa	0,4 g
TBE pufr	40 ml
směs přivést k varu, doplnit destilovanou vodou zpět na 40 ml, pokud dojde k větším ztrátám odparem a nalít do formy na agarosový gel, nechat vychladnout za pokojové teploty	

Tabulka 3.5:

TBE pufr 10×	1000 ml
TRIS, 890mM	107,8 g
H ₃ BO ₃ , 890mM	55 g
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	7,4 g
doplnit deionizovanou vodou na 1 l	

3.2.4 Příprava plasmidu

Plasmid je malá cirkulární molekula DNA, která je schopná samostatné replikace a proto se používá jako vektor pro vnášení genů do cílových organismů. Po vytvoření dostatečného množství kopií prázdného plasmidu a insertu je třeba je štěpit pomocí zvolených restrikčních endonukleas. Tímto způsobem vzniknou vzájemně komplementární koncové úseky DNA insertu i plasmidové sekvence a je možné je pomocí DNA ligasy kovalentně a definovaně spojit dohromady. Použití dvou typů endonukleas zajistí, že insert je vložen do plasmidu vždy ve stejné orientaci a zároveň minimalizuje vznik nepoužitelných sekvencí vzniklých spojením dvou a více insertních respektive plasmidových sekvencí.

Množení plasmidů probíhá jejich transformací do kompetentních buněk TOP10, které se nechají narůst v LB médiu přes noc v inkubátoru za stálého třepání (37 °C, 200RPM). Do těchto buněk je plasmid transformován dle následujícího protokolu:

- 1) 1 µl plasmidové DNA pipetovat do 40 µl buněčné kultury buněk TOP10
- 2) nechat vzorky 30 min inkubovat na ledu
- 3) provést teplotní šok ponořením vzorků na 45 s do vody o teplotě 42 °C
- 4) nechat vzorky 2 min inkubovat na ledu
- 5) přidat ke každému vzorku 400 µl LB média
- 6) třepat 1 hod při 37 °C a 200RPM
- 7) rozetřít na agarovou miskou, nechat vysušit a inkubovat při 37 °C přes noc

8) jednu z narostlých kolonií sterilně přenést do LB média a nechat narůst buněčnou kulturu obsahující plasmid

Vhodné buňky jsou selektovány tím, že na agarovou misku a do LB média jsou přidávána antibiotika, v jejichž přítomnosti buňky přežijí pouze tehdy, když přijaly plasmid nesoucí geny pro rezistenci.

Narostlá buněčná kultura je zpracována dle následujícího protokolu:

- 1) kulturu po 1,5 ml centrifugovat při 16 000×g 1 min, supernatant vylít
- 2) resuspendovat peletu 200 µl pufru PD1
- 3) přidat 200 µl pufru PD2, jemně promíchat a nechat 2 min inkubovat
- 4) přidat 300 µl pufru PD3, jemně promíchat a centrifugovat při 16 000×g 2 min
- 5) supernatant přelít do PD kolony a centrifugovat při 16 000×g 30s
- 6) vylít co protéklo kolonou, přidat do ní 400 µl pufru W1 a centrifugovat při 16 000×g 30s
- 7) vylít co protéklo kolonou, přidat do ní 600 µl pufru W2 a centrifugovat při 16 000×g 30s
- 8) vylít co protéklo kolonou a centrifugovat při 16 000×g 3 min pro usušení
- 9) vložit PD kolonu do sběrné zkumavky, přidat 50 µl sterilní vody, nechat 2 min inkubovat a centrifugovat při 16 000×g 2 min, eluát uchovávat v -20 °C

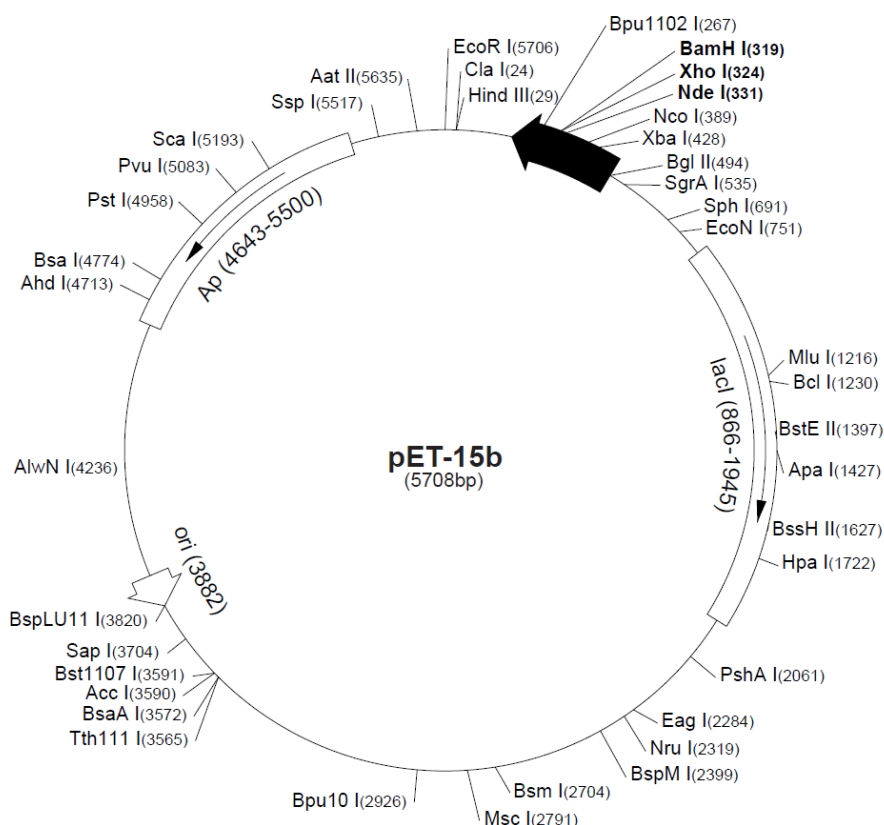
Připravený plasmid byl restričně štěpen přes noc dle následujícího protokolu:

8 µl	pufr NEB3, 10× koncentrovaný
70 µl	plasmid pET15b
2 µl	restriční endonukleasa BamHI
2 µl	restriční endonukleasa NdeI
82 µl	celkem

Celý objem ligační směsi byl nanesen na 1% agarosový gel a bylo provedeno její elektroforetické rozdělení (40min, 120V). Gel byl vizualizován pomocí UV lampy. Pomocí skalpelu byla vyříznuta část obsahující plasmidovou DNA a byla zpracována dle následujícího protokolu za použití kitu GenElute Gel Extraction:

- 1) zvážit vyříznutou část gelu
- 2) přidat úměrné množství pufru pro rozpouštění gelu (na 100 mg gelu 300 µl pufru) a nechat inkubovat v 50 °C do úplného rozpuštění gelu, rozpuštění pomoci občasným mícháním na vortexu
- 3) přidat úměrné množství isopropanolu (100 µl na 100 mg gelu) a důkladně promíchat na vortexu

- 4) připravit kolonu GenElute miniprep binding column do sběrné zkumavky a promýt jí 500 μ l pufru pro přípravu kolony centrifugací 1 min při 16 000 \times g
- 5) rozpuštěný gel po 700 μ l dávkovat na kolonu a centrifugovat 1 min při 16 000 \times g
- 6) vylít co proteklo kolonou, přidat 700 μ l pufru Wash Buffer na přečištění DNA a centrifugovat 1 min při 16 000 \times g
- 7) vylít co proteklo kolonou, vložit kolonu do čisté sběrné zkumavky, přidat 50 μ l sterilní vody a 1 min inkubovat při laboratorní teplotě
- 8) centrifugovat 1 min při 16 000 \times g, eluát uchovávat při -20 °C



Obr. 3.1: Schematická mapa plasmidu pET-15b. Všechny údaje po vnějším obvodu kruhu jsou kódová označení jednotlivých restrikčních míst, respektive restrikčních endonukleas tato místa rozpoznávajících. Čísla v závorkách značí jejich souřadnice v nukleotidové sekvenci. Uvnitř kruhu jsou informace o promotoru řídícím expresi insertovaného genu (*lacI* značí *lac* operon), místo počátku replikace důležité pro množení plasmidu v buňkách (*ori*, z angl. origin of replication, začátek replikace) a gen pro resistenci (*Ap*, ampicilinová resistence). Celková délka prázdného plasmidu je 5708 párů bází. Gen pro FOXO3 byl vložen mezi restrikční místa *BamHI* a *NdeI*. Zdroj obrázku databáze Addgene^[53].

3.2.5. Příprava PCR produktu

Insert je amplifikován pomocí PCR dle následujícího protokolu:

25 µl	enzymový koktejl REDTag PCR ReadyMix
1 µl	oligonukleotid pro vlastní vlákno (forward primer)
1 µl	oligonukleotid pro komplementární vlákno (reverse primer)
2 µl	templátová DNA
21 µl	sterilní voda
<hr/>	
50 µl	celkem

Tato směs je dále podrobena PCR podle programu:

95 °C	45 s	tání dvoušroubovice DNA	} 30×
55 °C	60 s	nasednutí oligonukleotidů na konce DNA	
72 °C	120 s	polymerace nových vláken DNA	
72 °C	12 min	ukončení reakce	
4 °C	neomezeně	tvorba nových dvoušroubovic DNA	

Nakonec je PCR produkt přečištěn dle následujícího protokolu:

- 1) pipetovat 0,5 ml PCR produktu do kolony GenElute miniprep binding column, umístit ji do sběrné zkumavky a centrifugovat při 16 000×g 30 s
- 2) eluát vylít, PCR produkt smíchat s pětinasobným množstvím roztoku Binding solution a centrifugovat při 16 000×g 1 min
- 3) eluát vylít, přidat 0,5 ml roztoku Wash solution a centrifugovat při 16 000×g 30 s
- 4) eluát vylít a centrifugovat při 16 000×g 2 min pro usušení
- 5) přendat kolonu do sběrné zkumavky, přidat 50 µl sterilní vody a centrifugovat při 16 000×g 1 min, eluát uchovávat v -20 °C

Připravený insert byl restričně štěpen přes noc dle následujícího protokolu:

5 µl	pufr NEB3, 10× koncentrovaný
43 µl	vkádaná sekvence DNA (gen pro FOXO3-DBD)
1 µl	restriční endonukleasa BamHI
1 µl	restriční endonukleasa NdeI
<hr/>	
50 µl	celkem

3.2.6 Ligace a transformace do expresních buněk

Po přípravě plasmidu a insertu je třeba ověřit znovu jejich velikost a koncentraci na agarosovém gelu a pomocí spektrofotometrického měření na nanodropu. Podle ní je určen jejich poměr pro přípravu ligační reakce. V tomto případě bylo postupováno dle následujícího protokolu:

1 µl	pufr T4, 10× koncentrovaný
7 µl	štěpený plasmid pET15b
1 µl	štěpená insertová DNA (gen FOXO3)
1 µl	ligasa T4
<hr/>	
10 µl	celkem

Takto připravená ligační směs je ponechána 2 h při pokojové teplotě a následně uložena při 4 °C. Vzniklý konstrukt je metodou teplotního šoku vnesen do expresních buněk BL21(DE3), které jsou ponechány narůst na agarové plotně. U vybraných kolonií je pomocí takzvané PCR kolonií (z anglického colony PCR) ověřeno, zda opravdu obsahují žádaný gen. PCR kolonií funguje tak, že ke vzorku bakterií z kolonie jsou přidány oligonukleotidy k hledanému genu. Zbytek probíhá stejně jako normální PCR. Pokud v bakteriích je gen zájmu, je takto amplifikován a snadno detekován pomocí horizontální agarové elektroforézy. Pokud není, PCR neproběhne a gel to jasně dokáže. PCR kolonií probíhá dle následujícího protokolu:

13,4 µl	sterilní voda
1,6 µl	10mM směs nukleotidtrifosfátů
2 µl	pufr LA PCR, 10× koncentrovaný
1 µl	forward primer
1 µl	reverse primer
1 µl	polymerasa LA
<hr/>	
20 µl	celkem

Z buněk, ve kterých prokazatelně je žádaný plasmid je připravena glycerolová konzerva skladovaná při -80 °C pro další pokusy. Kvalita plasmidu a případné bodové mutace jsou jasně určeny pomocí přečtení pořadí nukleotidů sekvenační reakcí. Sekvenaci provedl Dr. Jürgen Felsberg, Csc. v servisním středisku Mikrobiologického ústavu AVČR.

3.2.7 Použité konstrukty

V této práci byly použity následující tři konstrukty FOXO3-DBD. První konstrukt byl získán darem od dr. Ausserlechnera (spolupracující laboratoř v Medizinische Universität Innsbruck, Rakousko) a byl používán i v méj bakalářské práci. Problém tohoto konstruktu spočíval v neodštěpitelné histidinové kotvě na C-konci, která se podle NMR experimentů účastnila vazby na inhibitor S9. Z tohoto důvodu byl vytvořen druhý konstrukt v upraveném vektoru pET15b, který měl tuto kotvu přesunutou na N-konec. Tento konstrukt však měl nechráněný C-konec a podléhal proteolytické degradaci příliš rychle na to, aby bylo možné s ním efektivně pracovat. Třetí konstrukt byl získán od dr. Obšilové a histidinovou kotvu vůbec neobsahoval. Purifikace tohoto konstrukt probíhala pomocí GST afinitní chromatografie. Tento konstrukt byl použit pro další experimenty. Sekvence samotného FOXO3-DBD je vyvedena tučně a podtržena, sekvence histidinové kotvy je vyvedena tučně.

První konstrukt FOXO3-DBD (156-269) v plasmidu pGEX-6-P1:

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMA
IIRYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHK
TYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPOIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATF
GGGDHPPKSDLEVLFGPLGS**AWGNLSYADLITRAIESSPKRLTLSQIYEWVRCVPYFKDKGDSNSA**
GWKNSIRHNLSLHSRFRMVQNEGTGKSSWWIINPDGGKSGKAPRRRAVSMDNSNKYTKSRGRAAKLAAAL
EHHHHHH

Druhý konstrukt FOXO3-DBD (156-269) v plasmidu pET15b:

MGSS**HHHHHH**SSGENLYFQGSHM**AWGNLSYADLITRAIESSPKRLTLSQIYEWVRCVPYFKDKGDSNS**
SAGWKNSIRHNLSLHSRFRMVQNEGTGKSSWWIINPDGGKSGKAPRRRAVSMDNSNKYTKSRGRAAK

Třetí konstrukt FOXO3-DBD (156-269) v plasmidu pGEX-6-P1:

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMA
IIRYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHK
TYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPOIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATF
GGGDHPPKSDLEVLFGPLGS**AWGNLSYADLITRAIESSPKRLTLSQIYEWVRCVPYFKDKGDSNSA**
GWKNSIRHNLSLHSRFRMVQNEGTGKSSWWIINPDGGKSGKAPRRRAVSMDNSNKYTKSRGRAAK

3.3 Exprese a purifikace FOXO3-DBD

3.3.1 Exprese proteinu

K přípravě proteinu byl použit kmen bakterií *E. coli* BL21(DE3) vhodný pro expresi rekombinantních proteinů. Expresní testy nového konstruktů probíhaly v LB médiu (tabulka 3.6) Bakterie byly dlouhodobě uchovávány v glycerolové konzervě při -80 °C. Při použití bylo sterilně pipetováno 5 µl glycerolové konzervy do 5 ml LB média obsahujícího ampicilin (100 µg/ml). Takto připravené vzorky byly inkubovány přes noc při 37 °C a konstantním třepání. Poté byly přelity do připravených bání s 1 l LB média zároveň obsahující ampicilin o koncentraci 100 µg/ml. V těchto báních byla kultura ponechána růst za stálého třepání 200RPM při 37 °C. V pravidelných intervalech byly odebírány vzorky a měřena optická densita při 600 nm. Jako blank bylo použito čisté LB médium. Když optická densita dosáhla hodnoty 0,6; byla snížena teplota na 20 °C. Při dosažení optické density 0,8 byla indukována exprese přidávkem 1 ml 0,5M IPTG. Kultura byla ponechána za stejných podmínek přes noc.

Narostlá kultura byla následně centrifugována (4 °C, 2600×g, 40 min), resuspendována třepáním s lyzačním pufrém (tabulka 3.7) a zmrazena v -80 °C.

Tabulka 3.6:

LB médium:	1000 ml
trypton	10 g
NaCl	10 g
kvasinkový extrakt	5 g
H ₂ O	doplnit do 1l

Tabulka 3.7:

Lyzační pufr:	100ml
PBS 2×	20 ml 10×PBS (tabulka 3.8, strana 36)
DTT, výsledná koncentrace 10mM	0,154 g
EDTA, výsledná koncentrace 1mM	200 µl 0,5M roztoku
PMSF, výsledná koncentrace 1mM	1 ml 100mM roztoku
doplněno deionizovanou vodou na 100 ml	

Tabulka 3.8:

PBS 10×koncentrovaný	1000 ml
NaCl	80 g
KCl	2 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	14,4 g
NaN ₃	0,4 g
doplněno deionizovanou vodou na 1 l a pH upraveno na 7,4 pomocí 1M NaOH	

3.3.2 Lyze buněk

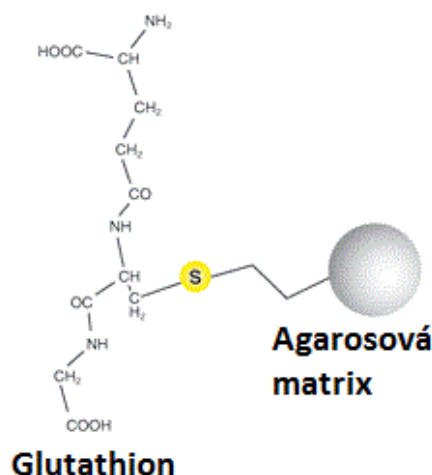
Po rozmrazení byla bakteriální suspenze přelita do tlustostěnné kádinky a 30 min inkubována za stálého míchání při 4 °C v přítomnosti lysozymu (0,1 mg/ml). Po inkubaci s lysozymem byl vzorek sonikován 64 min v cyklech 15 s sonikace, 45 s pauza, při výkonu 55W. Vzniklá suspenze byla centrifugována (4 °C, 24000×g, 45 min).

3.3.3 GST afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie je hojně využívanou metodou pro purifikaci proteinových roztoků. Využívá afinity kotev zavedených do konstruktů ke stacionární fázi kolony. Může to být mnoho různých interakcí, např. chelatační chromatografie pomocí nikelnatých či kobaltnatých kationtů, afinitní chromatografie dvou silně se vážících partnerů atd. Mezi druhou skupinu patří i použitá afinitní chromatografie využívající interakce mezi glutathion-S-transferasou (dále GST) a glutathionem. GST je proteinová afinitní značka o velikosti 27 kDa, která je připojena na N-konec proteinu a pomáhá tak zvyšovat jeho rozpustnost. Mezi GST a proteinem se nachází sekvence, kterou rozpoznává PreScission proteasa umožňující pak její následné odštěpení. GST se velmi silně váže na glutathion, který je kovalentně připojen na stacionární fázi kolony. To umožní navázání pouze žádaného proteinu a průtok všeho ostatního. Eluce probíhá roztokem s vysokým obsahem volného glutathionu, který kompetuje o vazbu s tím vázaným na koloně a GST se postupně uvolňuje. Schematicky znázorněno na obrázku 3.2 na straně 37.

Kolona obsahující 5 ml GST sepharosy je nejprve důkladně promyta deionizovanou vodou a elučním puftrem (tabulka 3.9 na straně 38). Následně je sepharosa vymyta z kolony a za pomalého pravidelného jemného míchání inkubována 1 h při 4 °C, aby došlo k důkladnému navázání proteinů na stacionární fázi kolony pro afinitní chromatografii. Po inkubaci je vzorek postupně nanesen zpět na kolonu tak, aby žádná sepharosa nezůstala nalepená na stěnách kádinky, ve které se inkubovala. Toho je dosaženo několikanásobným vypláchnutím čistícím puftrem, který se v dalším kroku nanáší na kolonu. Zatímco protein obsahující GST se s vysokou afinitou váže na stacionární fázi, zbytek vzorku je mobilní fází unášen z kolony pryč. Pro urychlení celého procesu je kolona připojena na peristaltickou pumpu. Následuje purifikační krok, kdy je kolona promyta 400 ml elučního pufru, který ovšem ještě neobsahuje samotný glutathion. Tímto krokem se zvyšuje finální čistota vzorku, protože se z kolony vymývají nespecificky vázané proteiny bez GST kotvy. Nakonec je potřeba protein z kolony uvolnit. Toho se dosahuje použitím elučního pufru s glutathionem a vyšším pH, který narušuje interakci GST se stacionární fází. To umožňuje vymytí žádaného vzorku z kolony mobilní fází. Tento proces již probíhá bez použití peristaltické pumpy, eluce je pouze gravitační a vzorek je jímán do připravených zkumavek. Kolona je regenerována dle následujícího protokolu:

- 1) 4×objem kolony 70% ethanol
- 2) 5×objemem kolony 1×PBS (pH=7,3)
- 3) 2×objem kolony 6M guanidin hydrochlorid (570 g na 1 l roztoku)
- 4) 5×objemem kolony 1×PBS (pH=7,3)
- 5) uchovávat naložené v 20% ethanolu při 4 °C



Obr 3.2: Schematické znázornění náplně kolony pro GST afinitní chromatografii. Agarosová gelová fáze rovnoměrně vyplňuje kolonu a v definovaných vzdálenostech jsou na ní kovalentně připojeny molekuly glutathionu pomocí volné SH skupiny. Imobilizovaný glutathion je specificky rozpoznáván GST doménou fúzního proteinu a vzniká velmi pevná nekovalentní vazba, která protein udrží u stacionární fáze kolony. Při eluci je nutné kolonu promýt roztokem s vysokou koncentrací glutathionu, aby kompetice o vazebná místa uvolnila GST doménu z kolony.

Tabulka 3.9:

Pufr pro GST afinitní chromatografii	500 ml
glycerol, 10%	50 g
TRIS, pH=7,5; 20mM	10 ml 1M roztoku
EDTA, 1mM	1 ml 0,5M roztoku
DTT, 10mM	0,77 g
NaCl, 500mM	15 g
pro eluci odebrat 60 ml, přidat 0,186 g glutathionu (10mM) a upravit pH na 8	

3.3.4 Niklová chelatační chromatografie

Postup je obdobný jako u GST afinitní chromatografie, rozdílné jsou jen použité pufrы. Tato afinitní chromatografie byla použita pro purifikaci izotopově značených proteinů. Kolona obsahující 5 ml Chelating Sepharose Fast Flow je používána dle následujícího protokolu:

- 1) promytí kolony 20 ml deionizované vody, 15 ml STRIPP (tabulka 3.10), 60 ml 0,1M NiSO₄, 15 ml deionizované vody a nakonec 15 ml pufru pro chelatační chromatografii (tabulka 3.11)
- 2) nanesení sonikátu na kolonu a promytí 20 ml pufru pro chelatační chromatografii 1 a 300 ml směsi pufrů 1 a 2 pro chelatační chromatografii v poměru 9:1
- 3) gravitační eluce proteinu pomocí pufru 2 (tabulka 3.12 na straně 39) pro chelatační chromatografii a jímání frakcí do mikrozku mávek
- 4) regenerace kolony 30 ml STRIPP, 20 ml deionizované vody a 15 ml 20% ethanolu, ve kterém byla následně uchovávána při 4 °C

Tabulka 3.10:

STRIPP	450 ml
EDTA, 0,5M (pH=8)	300 ml
NaCl, 5M	150 ml

Tabulka 3.11:

Pufr 1 pro chelatační chromatografii	500 ml
PBS 1×	50 ml 10×PBS
NaCl, výsledná koncentrace 0,5 M	14,6 g
imidazol, výsledná koncentrace 1 mM	0,035 g
β-merkptoethanol, výsledná koncentrace 2 mM	69,5 μM

Tabulka 3.12:

Pufr 2 pro chelatační chromatografii	500 ml
PBS 1×	50 ml 10×PBS
NaCl, výsledná koncentrace 0,5 M	50 ml 5 M NaCl
imidazol, výsledná koncentrace 0,6 M	10,2 g
β-merkaptoethanol, výsledná koncentrace 2 mM	69,5 μM

3.3.5 Stanovení koncentrace proteinu a odštěpení afinitní kotvy

Koncentrace proteinu je stanovena spektrofotometricky. Je to možné díky Beer-Lambertovu vztahu:

$$A = \epsilon \times c \times l$$

Absorbance **A** je změřena experimentálně při 280 nm, délka kyvety **c** je známá (1 cm) a molární absorpční koeficient ϵ byl vypočten z primární struktury pomocí algoritmu ProtParam v databázi UniProt (<http://www.uniprot.org>). Podle konkrétní proteinové koncentrace bylo ke vzorku přidáno odpovídající množství Precision proteasy, která během dialýzy odštěpila GST doménu od FOXO-DBD. Množství proteasy se měří v jednotkách U (z anglického units), přičemž jedna odpovídá 0,33 μl proteasy a je schopna rozštěpit 0,1 mg fúzního proteinu za dobu, po kterou je protein dialyzován. Dialýza samotná probíhala v dialyzační membráně propustné pro částice menší než 6-8 kDa (cut-off 6-8 kDa dle výrobce) nejprve 5 h v prvním dialyzačním pufru (tabulka 3.13), ve kterém je EDTA kvůli chelataci zbytků kovových iontů. Následně je dialyzační membrána přenesena do druhého dialyzačního pufru (tabulka 3.14 na straně 40) a dialyzována přes noc. Tento krok je nutný kvůli převedení proteinu do pufru používaného pro další purifikační krok. Druhý dialyzační pufr byl následně přefiltrován přes 0,45 μm síto a použit pro kationtově výměnnou chromatografii.

Tabulka 3.13:

První dialyzační pufr	odměřené množství
10% (w/v) glycerol	100 g
TRIS, 20 mM, pH 7,5	20 ml 1M roztoku
EDTA, výsledná koncentrace 1 mM	2 ml 0,5M roztoku
DTT, výsledná koncentrace 1 mM	0,154 g
doplněno deionizovanou vodou na 1 l	

Tabulka 3.14:

Druhý dialyzační pufr	odměřené množství
kyselina citrónová, výsledná koncentrace 50 mM	10,5 g
EDTA, výsledná koncentrace 2 mM	2 ml 0,5M roztoku
DTT, výsledná koncentrace 2 mM	0,31 g
doplněno deionizovanou vodou na 1 l, pH upraveno na 6,3 pomocí 1M NaOH, přefiltrováno přes membránový filtr s 0,45 µm sítí	

3.3.6 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS

Elektroforetické metody obecně slouží k dělení látek v elektrickém poli dle jejich náboje a velikosti. Elektricky nabitě částice jsou urychlovány elektrickým polem. Prostředí gelu, ve kterém se pohybují, naopak pohyb omezuje. V případě proteinů se nejčastěji používá polyakrylamidový gel o různé hustotě, podle toho jak velké proteiny je třeba rozdělit. Akrylamid o různé hustotě polymeruje v různě husté síti vláken. Takto vzniklé síť brzdí proteiny putující gelem. Polymerace gelu je aktivována dodáním radikálů (persulfát amonný). Tato metoda se používá hlavně k ověření, že v daném vzorku jsou proteiny o konkrétní molekulové hmotnosti. Přidáním dodecylsulfátu sodného (dále SDS) dochází k denaturaci proteinu. Proteiny solvatované tímto silným tensidem mají stejnou hustotu záporného náboje, a tak se pod vlivem elektrického pole pohybují směrem k anodě. Protože se SDS váže na proteiny v konstantním poměru, jejich rychlost pohybu v elektrickém poli je závislá pouze na velikosti molekuly proteinu.

Po každém dílčím kroku purifikace proteinů je nutné pomocí SDS elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (dále SDS PAGE) kontrolovat složení vzorku. Složení používaných gelů je shrnuto v tabulkách 3.15-22 na straně 41 a 42. Všechny gely použité pro SDS PAGE v této práci obsahovaly 15% (v/v) akrylamid. Po nanesení vzorků byly gely vystaveny elektrickému napětí 200 V po dobu 50 min. Všechny vzorky nanášené na gely obsahovaly 10 µl roztoku proteinu a 5 µl barvy (tabulka 3.20 na straně 41). Jako standard bylo použito 10 µl roztoku Precision Plus Protein Standard Dual Color (molekulové hmotnosti 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 a 250 kDa).

Po ukončení elektroforetické reakce byly gely barveny pro vizualizaci proteinů 10 min v barvicím roztoku (tabulka 3.21 na straně 42) a následně odbarveny louhováním v odbarvovacím roztoku (tabulka 3.22 na straně 42).

Tabulka 3.15:

Složení separačního gelu	pipetovaný objem
Pufr pro separační gel	3 ml
Rotiphorese Gel 30	6 ml
10% (w/v) APS	0,1 ml
deionizovaná voda	2,88 ml
TEMED	0,012 ml

Tabulka 3.16:

Pufr pro separační gel	odměřené množství
2 M Tris-HCl, pH 8,8	75 ml
10% SDS	4 ml
deionizovaná voda	21 ml

Tabulka 3.17:

Složení zaváděcího gelu	pipetovaný objem
Pufr pro separační gel	1 ml
Rotiphorese Gel 30	0,5 ml
10% (w/v) APS	0,045 ml
deionizovaná voda	2,25 ml
TEMED	0,005 ml

Tabulka 3.18:

Pufr pro zaváděcí gel	odměřené množství
1 M Tris-HCl, pH 6,8	50 ml
10 % SDS	4 ml
deionizovaná voda	46 ml

Tabulka 3.19:

Pufr pro elektroforézu	výsledná koncentrace
TRIS-HCl, pH 8,3	50 mM
glycin	385 mM
SDS	0,1%

Tabulka 3.20:

Pufr pro barvení vzorků	pipetovaný objem
TRIS	0,6 ml 1M, pH = 6,8
50% glycerol	5 ml
10% SDS	2 ml
β-merkaptoethanol	0,5ml
1% bromfenolová modř	1 ml
deionizovaná voda	0,9 ml

Tabulka 3.21:

Barvící roztok	odměřené množství
CBB R250	1 g
methanol	450 ml
kyselina octová	100 ml
doplněno deionizovanou vodou na 1 l	

Tabulka 3.22:

Odbarvovací roztok	odměřené množství
methanol	100 ml
kyselina octová	100 ml
doplněno deionizovanou vodou na 1 l	

3.3.7 Kationtově výměnná chromatografie

Iontově výměnná chromatografie se používá k separaci nabitých částic. K separaci dochází díky elektrostatické interakci mezi stacionární fází kolony a částicemi unášenými kolonou mobilní fází. Jako stacionární fáze se používá sepharosa, která je upravená pro daný typ iontů - nese buď kladně, nebo záporně nabitě boční skupiny. V této práci byla použita kationtově výměnná chromatografie, protože v použitém pufru (pH=6,3) má FOXO3-DBD (pI=10,24) kladný náboj. Cílem tohoto kroku purifikace je hlavně oddělit nečistoty přítomné v roztoku vzorku, zejména odštěpenou GST doménu (pI=5,73; na kolonu se nenaváže, protože má v daném pufru stejný náboj jako stacionární fáze). pI bylo určeno teoretickým výpočtem pomocí algoritmu ProtParam na bioinformatickém portálu <http://www.expasy.org>.

Samotná chromatografie proběhla na koloně MonoS 5/50 (průměr/délka kolony v mm) o objemu 1 ml (maximální přípustný tlak na kolonu je 4 MPa). Kolona byla připojena k FPLC (fast protein liquid chromatography) přístroji ÄKTAprime ovládaném operačním softwarem "Unicorn 4.11". Vzorek i pufr nanášené na kolony bylo nutné filtrovat přes 0,22 µm; resp. 0,45 µm filtry, aby se do přístroje nedostaly agregáty. Kolona byla promyta vazebným a elučním pufrům (tabulky 3.23 a 3.24 na straně 43). Veškerý roztok proteinu byl postupně nanesen na kolonu a následně eluován gradientem iontové síly (rostoucí podíl elučního pufru v mobilní fázi, 0 → 100%, během 10 min při průtoku 1 ml/1 min). Eluát byl jímán do mikrozku mávek a udržován na ledu. Fyzikálně

chemické vlastnosti, z nichž byl určen obsah proteinu v eluátu (absorbance při 280 nm, konduktivita a tlak), byly kontrolovány na ústí kolony.

Tabulka 3.23:

Vazebný pufr na kationtově výměnnou chromatografii, pH 6,3	odměřené množství
kyselina citrónová, výsledná koncentrace 50 mM	10,5 g
EDTA, výsledná koncentrace 2 mM	2 ml 0,5M roztoku
DTT, výsledná koncentrace 2 mM	0,31 g
doplněno deionizovanou vodou na 1 l, pH upraveno na 6,3 pomocí 1M NaOH, přefiltrováno přes membránový filtr s 0,45 µm sítím	

Tabulka 3.24:

Eluční pufr na kationtově výměnnou chromatografii, pH 6,3	odměřené množství
kyselina citrónová, výsledná koncentrace 50 mM	10,5 g
EDTA, výsledná koncentrace 2 mM	2 ml 0,5 M EDTA
DTT, výsledná koncentrace 2 mM	0,31 g
NaCl, výsledná koncentrace 1 M	58,4 g
doplněno deionizovanou vodou na 1 l, upravit pH na 6,3 pomocí 1M NaOH, přefiltrováno přes membránový filtr s 0,45 µm sítím	

3.3.8 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie je metoda založená na principu dělení látek podle jejich hydrodynamického poloměru a je hojně využívána pro čištění vzorků proteinů. Stejně jako předchozí typy chromatografií probíhá na koloně, tentokrát je však naplněna polymerním gelem s definovanou velikostí pórů. Tento gel funguje jako stacionární fáze, na které dochází k dělení látek unášených mobilní fází podle toho, jak jim jejich hydrodynamický poloměr umožňuje pronikat póry. Částice s velkým hydrodynamickým poloměrem proniknou pouze největšími póry a kolonou prochází bez většího odporu, unášeny mobilní fází. Částice s menším hydrodynamickým poloměrem však mohou procházet i menšími póry a difundovat skrze síť tvořenou stacionární fází kolony. Tím pádem je zdržen jejich pohyb s mobilní fází a dochází k jejich oddělení od látek s větším hydrodynamickým poloměrem. Mezi hydrodynamickým objemem molekul a jejich elučním objemem je logaritmická závislost.

Eluát získaný kationtově výměnnou chromatografií byl koncentrován na objem 2 ml (molekulové síto propustné pro částice menší než 10kDa, 4 °C, 1620×g). Pro purifikaci FOXO3-DBD byla použita kolona Superdex 75 10/300 (průměr/délka kolony

v mm) o objemu 24 ml s tlakovým limitem 1,8MPa. Stejně jako u předchozího kroku byl použit přístroj ÄKTAprime a operační software Unicorn 4.11. Kolona byla před použitím ekvilibrována fosfátovým pufrém (tabulka 3.25) přefiltrovaným přes 0,45 µm filtr. Proteinový koncentrát byl také filtrován a nadávkován na kolonu. Frakce obsahující protein určeny pomocí měření absorbance v ústí kolony. Celková koncentrace byla určena spektrofotometricky. Protein byl nakonec zmražen po přidání 10% (v/v) glycerolu a skladován při -80 °C.

Tabulka 3.25:

Fosfátový pufr pro gelovou permeační chromatografii, pH 6,5	odměřené množství
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, výsledná koncentrace 13,7 mM	2,137 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O, výsledná koncentrace 6,3 mM	2,253 g
KCl, výsledná koncentrace 50mM	3,730 g
DTT, výsledná koncentrace 5 mM	0,308 g
doplněno chlazenou deionizovanou vodou na 1 l	

3.4 Nukleární magnetická rezonance

3.4.1 Příprava vzorků na NMR měření

Pro použití NMR spektroskopie je třeba připravit vzorek proteinu obohacený o NMR aktivní jádra. Pro měření vícerozměrných spekter nutných ke strukturním studiím je nutné mít ve vzorku více aktivních jader. ¹H se ve vzorku vyskytuje přirozeně v dostatečném zastoupení, ale podíl ¹⁵N a ¹³C je třeba uměle zvýšit. Toho se dá dosáhnout pomocí exprese proteinu na tzv. minimálním médiu. Minimální médium M9 (tabulka 3.26 na straně 45), které bylo použito pro základní NMR měření, obsahovalo jako jediný zdroj dusíku značený ¹⁵NH₄Cl. V minimální médiu použitém pro pokročilejší měření bylo třeba přidat další NMR aktivní jádro a jako jediný zdroj uhlíku byla tedy použita ¹³C-glukosa.

Tabulka 3.26:

Minimální médium M9:	1000 ml
Na ₂ HPO ₄	7,5 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1 g
doplněno deionizovanou vodou na 1 l, sterilizováno v autoklávu	
po vychladnutí přidány tyto roztoky:	
MgSO ₄	2 ml 1M roztoku
CaCl ₂	0,1 ml 1M roztoku
glukosa	4 g
thiamin-hydrochlorid	1 ml 1M roztoku
všechny roztoky filtrovány přes 0,22μm filtr	

Protein byl připraven rekombinantní expresí v *E. coli* (detaily popsány v části 3.3). Při gelové permeační chromatografii, posledním kroku purifikace, byl použit fosfátový pufr (pH=6,5) bez redukčních činidel, aby bylo možné vzorek použít pro bezproblémové měření pomocí NMR. Takto připravená FOXO3-DBD byla koncentrována na 213μM (1,26 mg/ml) roztok, který byl dále použit pro samotné měření.

Z důvodu technických parametrů kyvet používaných v NMR spektroskopii na konkrétním přístroji dostupném pro tato měření, bylo nutné použít alespoň 700 μl vzorku. Aby bylo možné porovnávat jednotlivá NMR měření mezi sebou, je nutné, aby vzorky obsahovaly vnitřní standard. V proteinovém NMR se používá 10% D₂O. Na rozdíl od standardů používaných v jiných než biologických aplikacích této metody neovlivňuje D₂O vzorek samotný. Pomocí vnitřního standardu se kalibruje magnetické pole přístroje. Samo o sobě je sice velmi homogenní, není však dokonalé a stálé v čase. Tyto nedokonalosti jsou způsobeny postupným ohříváním supravodivé cívky generující magnetické pole přístroje. Cívka je ponořena v dvojité Dewarově nádobě chlazené tekutým heliem a dusíkem, ovšem izolace není dokonalá a supravodivé vlastnosti se s rostoucí teplotou rychle ztrácí.

Při měření vzorků bylo také nutné přidat kromě 10% D₂O ještě 10% dimethylsulfoxid (dále DMSO). Nízkomolekulární látka S9, jejíž interakce s FOXO3-DBD byla měřena, je špatně rozpustná ve vodných pufrech (koncentrace nepřesahuje 1 mM). Zásobní roztoky byly připraveny rozpuštěním těchto látek v DMSO. FOXO3-DBD snáší 10% DMSO dobře, jak bylo dokázáno sérií různých

spektrofotometrických měření. Při přidávání nízkomolekulárního ligandu S9 bylo třeba postupovat po malých dávkách (2 μ l), aby nedošlo k vysrážení. Celková koncentrace proteinu ve finálním vzorku byla 170 μ M.

Takto připravené vzorky byly pipetovány do kyvet pro NMR spektroskopii a měřeny na spektrometru Bruker Avance III s vodíkovou frekvencí 600 MHz dostupném na Přírodovědecké fakultě UK. Měření prováděl RNDr. Zdeněk Tošner, Ph.D.

3.4.2 Měření spekter FOXO3-DBD značené ^{15}N

Bylo provedeno několik měření, z nichž nejdůležitější bylo změření heteronukleárních jednokvantových korelačních spekter (dále HSQC). V tomto typu dvoudimenzionální NMR spektroskopie dochází k excitaci citlivějších vodíkových jader pomocí radiofrekvenčního pulsu, následnému přenosu polarizace vývoji chemického posunu a J-interakce na méně citlivých jádrech dusíku. Po vyvinutí těchto veličin je polarizace selektivním pulsem vrácena zpět na vodíková jádra, kde je měřena. Výhodou tohoto postupu oproti přímému měření všech jader je navýšení intenzity signálu a lepší odstup signálu od šumu. Toho je dosaženo proto, že ^1H jádra mají téměř desetkrát vyšší gyromagnetický poměr než ^{15}N .

Chemický posun je veličina, která ukazuje nehomogenity ve vnějším magnetickém poli přístroje způsobené přítomností magnetických polí okolních jader. Je tedy možné rozlišit dvě stejná jádra s různým chemickým okolím. Protože jde o heteronukleární korelace, předmětem zájmu je i J-interakce jader mezi kterými dochází k přenosu magnetizace. J-interakce je nepřímá spin-spinová interakce, kdy jsou jádra ovlivněna jinými NMR aktivními jádry ve svém okolí. Tato interakce má za následek štěpení signálu na multiplety a zjednodušuje vyhodnocování spekter, protože umožňuje říci, která jádra jsou blízká v primární sekvenci chemické látky.

Při měření proteinových HSQC spekter lze velmi jednoduše určit, zda je protein v nativním stavu a zda v něm setrvá i v průběhu celého NMR měření, které v případě složitějších pokusů může trvat desítky hodin. Dvoudimenzionální spektrum ^1H - ^{15}N korelací má typický tvar pro proteiny v nativní konformaci, stejně jako pro denaturované proteiny. Při denaturaci proteinu dochází ke ztrátě specifického

chemického okolí a většina vodíkových jader tak bude okupovat několik málo pozic na ose chemického posunu vodíku.

Prvním krokem při měření ^{15}N značené FOXO-DBD bylo ověření sbalení proteinu a následně porovnání naměřeného spektra s HSQC spektrem publikovaným Wangem et al.^[20]. Následovalo měření HSQC spekter FOXO3-DBD v přítomnosti různých koncentrací nízkomolekulárního inhibitoru S9. V případě, že by se inhibitor navázal na povrch proteinu, NMR signály aminokyselin účastnících se vazby by se nějakým způsobem posunuly. Inhibitor samotný není značený NMR aktivními jádry a v HSQC spektru není přímo pozorovatelný.

3.4.3 Měření spekter FOXO3-DBD značené ^{15}N a ^{13}C

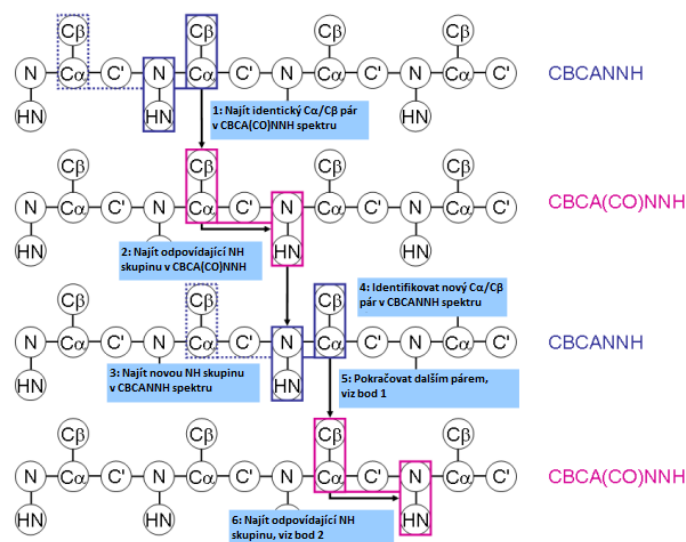
Dalším krokem nutným k určení, které aminokyseliny se účastní interakce s inhibitorem, je přiřazení jednotlivých signálů ve spektrech ke konkrétním residuům. Aby bylo možné něco takového udělat, nestačí pouze jednou značený protein, protože spektra jsou příliš složitá a většinu signálů není možné jednoznačně přiřadit. Je potřeba značit protein ještě dalším NMR aktivním jádrem a změřit další druhy spekter, aby bylo možné přidat třetí dimenzi a zvýšit tak jejich čitelnost.

Dvojitě značená FOXO3-DBD byla připravena z důvodu nesrovnalostí v HSQC spektru změřeném na ^{15}N značeném vzorku a spektru publikovaném v literatuře. Protože ve spektru publikovaném v literatuře byly přiřazeny jednotlivé signály k aminokyselinám, bylo porovnáním spekter jednoduše určeno, která residua se účastní vazby na inhibitor. Problém ovšem představoval C-konec proteinu, který se lišil od toho publikovaného v literatuře. Námi měřená FOXO3-DBD měl na C-konci histidinovou kotvu připojenou přes několik aminokyselin, které v proteinu publikovaném v literatuře nebyly. Jeden z posunutých signálů, který značil aminokyselinu vážící se na inhibitor, nebylo možné rozluštit porovnáním spekter. Z tohoto důvodu bylo nutné připravit vlastní dvojitě značený protein a provést sekvenční přiřazení.

Příprava dvojitě značeného proteinu se kromě ceny v ničem neliší od přípravy jednou značeného. Kromě již zmíněných spekter se měří celá řada korelací mezi třemi NMR aktivními jádry, hlavně spektra typu HN(CO)CACB a HNCACB, pomocí kterých lze rekonstruovat primární sekvenci proteinu.

3.4.4 Vyhodnocení spekter a sekvenční přiřazení

Pro úspěšné sekvenční přiřazení je nutné znát aminokyselinovou sekvenci proteinu a mít dostatečně kvalitní sadu spekter, ze které je možné určit signály jednotlivých aminokyselin. Protože jsou spektra trojrozměrná, je potřeba pracovat s řezy a vzájemně porovnávat několik typů spekter. Pro takovýto postup je nutné použít specializovaný software, například "CCPNMR"^[54] nebo "Sparky"^[55]. Důležité je najít nějaký výchozí bod, ze kterého se poté dá pokračovat reziduum po reziduu a přiřadit celý protein. Ideálním výchozím bodem jsou aminokyseliny glycín (nemá C β a tedy má pouze jeden signál pro celou aminokyselinu), alanin, serin, threonin (jejich C β signál má výrazně odlišnou hodnotu chemického posunu než ostatní aminokyseliny) a prolin, valin a isoleucin (jejich C α signál má jinou výrazně jinou hodnotu chemického posunu než zbytek aminokyselin). Popsáno na obrázku 3.3 na straně 49. Jakmile je nalezen takovýto výchozí bod, lze postupovat krok po kroku porovnáváním HN(CO)CACB a HNCACB spekter. V HNCACB spektru jsou signály odpovídající C α a C β aminokyseliny **i** a C α a C β aminokyseliny **i-1**. Všechny korelují s amidovým vodíkem aminokyseliny **i**. V HN(CO)CACB je specifickou pulzní sekvencí docíleno toho, že magnetizace teče pouze přes karbonylový uhlík na předchozí aminokyselinu a ve spektru jsou tedy signály odpovídající C α a C β aminokyseliny **i-1**. Oba opět korelují s amidovým vodíkem aminokyseliny **i**. Porovnáním těchto spekter je možné určit, která aminokyselina je vedle té, která byla zvolena jako výchozí bod. Systematickým opakováním tohoto postupu je možné přiřadit všechny signály ve spektru k jednotlivým aminokyselinám. Spektra však nejsou dokonalá a z různých technických důvodů neobsahují všechny signály, které by měla. Spektra byla zpracována ve spolupráci s RNDr. Zdeňkem Tošnerem, Ph.D.



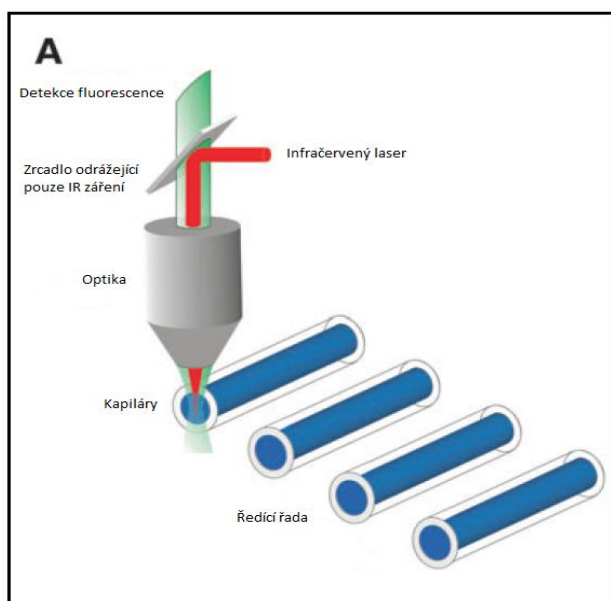
Obr. 3.3: Schéma znázorňující princip sekvenčního přiřazení krosníků ve spektru jednotlivým aminokyselinám. Tímto postupem je možné přiřadit většinu signálů, ne však úplně všechny. Zbytek je někdy možné přiřadit vylučovací metodou ale je možné, že některé signály není možné přiřadit vůbec. Typickým příkladem nepřiraditelných signálů je histidinová kotva, u které není možné rozlišit jednotlivé histidiny. Obrázek přejat a upraven z Protein NMR^[56].

3.5 Mikrotermoforéza

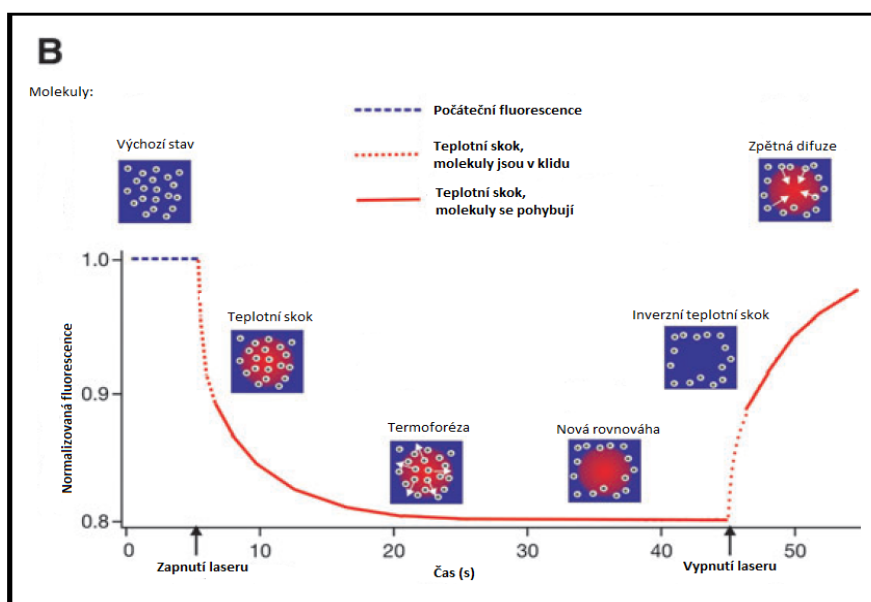
Mikrotermoforéza (dále MST) je moderní metodou měření termodynamických vlastností částic v roztoku. Velkou výhodou oproti příbuzným technikám je malá spotřeba vzorku a možnost měření K_D i u slabě se vážících inhibitorů. Měřené molekuly je ovšem nutné značit fluorescenční barvou, což částečně neguje výhody použití této metody. Principem je vytvoření teplotního gradientu na mikroskopické úrovni pomocí infračerveného laseru. Infračervené záření lokálně značně zvýší teplotu a na ní závislou difuzi. Měřením změn fluorescence během ohřívání a ochlazování se dá velmi přesně měřit rovnovážná konstanta vazby molekul v roztoku. Je to možné díky tomu, že fluorescence samotných molekul závisí na jejich solvatačním obalu, který se při interakci mění, a proto lze rozlišit signál molekul účastnících vazby od molekul volných^[57,58,59].

Byla vytvořena dvojková ředící řada roztoku inhibitoru S9 v rozsahu 1000-0,03 μ M, aby bylo možné správně skenovat a vyhodnotit intenzitu laseru, stejně jako následně určit disociační konstantu. Dále byly připravené alikvoty smíchány s roztokem FOXO3-DBD ve fosfátovém pufru tak, aby výsledný obsah DMSO byl 10% a protein byl 0,1 μ M. Vzorky byly centrifugovány 10 min (15 000 \times g, 4 °C) a nasáty do úzké kapiláry o

vhodných optických vlastnostech (výrobce dodává celou řadu různých kapilár vhodných pro různé typy vzorků) pomocí kapilární elevace a vložen do přístroje Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies). Přístroj byl ovládán pomocí operačního softwaru "NT control". Automaticky proběhl průzkum kapilár a byla zvolena vhodná intenzita laseru. Toto měření probíhalo na Ústavu organické chemie a biochemie AVČR, kde je tento přístroj dostupný. Průběh experimentu je znázorněn na obrázcích 3.5 a 3.6 (na straně 52).



Obr 3.4: Princip měření fluorescence během MST experimentu. Excitační a detekční optika vychází ze stejného místa z důvodu robustnosti tohoto uspořádání a možnosti velmi přesně měřit teplotní rozdíly (s přesností na mK). Objem vzorku v kapiláře je 4 μ l. Obrázek přejat a upraven z Jerabek-Willemsen et al. ^[60].



Obr 3.5: Průběh termoforetického experimentu. Ve výchozím stavu je vzorek v tepelné rovnováze s okolím a fluorescence skenovaného objemu je konstantní. Po zapnutí infračerveného laseru je molekulám dodávána energie a v měřeném objemu se zvyšuje teplota, což má za následek odpovídající nárůst difuze. Vlivem difuze dochází k termoforetickému efektu, tedy úbytku molekul fluoroforu v měřeném objemu a tedy k poklesu fluorescence, který je v reálném čase zaznamenáván. Po vypnutí laseru dochází k postupnému návratu do tepelné rovnováhy a návratu fluorescence na původní hodnotu z důvodu zpětného nastolení rovnováhy a difuze molekul fluoroforu zpět do měřeného objemu. Z hodnot fluorescence pro různé koncentrované vzorky lze vypočítat disociační konstantu. Experimentálně změřené body jsou proloženy křivkou, jejíž inflexní bod číselně odpovídá hledané konstantě. Obrázek přejat a upraven z Jerabek-Willemsen et al. ^[60].

3.6 Nativní elektroforéza

Nativní elektroforéza (dále EMSA, z anglického electrophoretic mobility shift assay) je elektroforetická metoda používaná k dokazování interakcí makromolekul mezi sebou i s nízkomolekulárními ligandy. Principem je stejně jako u SDS PAGE dělení látek elektrickým napětím v polyakrylamidovém gelu, existuje však několik zásadních rozdílů. Na rozdíl od SDS PAGE musí EMSA probíhat za nativních podmínek, jinak by nebylo možné pozorovat fyziologické funkce zkoumaných molekul. Nepoužívá se tedy SDS ani jiné denaturační činidlo. Je tedy nutné použít vhodný pufr. Zkoumané molekuly musí mít vhodný náboj, aby vůbec došlo k jejich putování gelem v elektrickém poli. Hlavní myšlenkou této metody je fakt, že pokud zkoumané molekuly interagují, putují pak gelem jako jeden celek. Porovnáním molekulových hmotností se standardem a ostatními vzorky lze rozhodnout, zda došlo k nějaké interakci nebo ne ^[61].

Byla připravena řada vzorků o různé koncentraci inhibitoru a konstantní koncentraci DNA, FOXO3-DBD a procentuálním obsahem DMSO (15%). Vzorky byly připraveny dle tabulky 3.25.

Tabulka 3.25: Příprava vzorků pro EMSA

#	FOXO3-DBD*	DNA*	ligand	koncentrace	DMSO	voda	barva	celkem
1	0	8 µl	0	0	6 µl	18 µl	8 µl	40 µl
2	5 µl	0	0	0	6 µl	23 µl	8 µl	40 µl
3	5 µl	8 µl	0	0	6 µl	18 µl	8 µl	40 µl
4	5 µl	8 µl	1 µl	25 µM	5 µl	18 µl	8 µl	40 µl
5	5 µl	8 µl	2 µl	50 µM	4 µl	18 µl	8 µl	40 µl
6	5 µl	8 µl	3 µl	75 µM	3 µl	18 µl	8 µl	40 µl
7	5 µl	8 µl	4 µl	100 µM	2 µl	18 µl	8 µl	40 µl
8	5 µl	8 µl	6 µl	150 µM	0	18 µl	8 µl	40 µl
9	5 µl	8 µl	2 µl	200 µM	4 µl	18 µl	8 µl	40 µl

*koncentrace proteinu a DNA ve finálním vzorku je 21µM, respektive 25µM

Nejdříve byl připraven roztok FOXO3-DBD s vodou a ligandem, respektive DMSO. Následovala 10min inkubace a přidavek DNA. Po další 20min inkubaci byla přidána i barva pro EMSA (tabulka 3.27 na straně 56). Takto připravené vzorky byly pipetovány na připravené 12% polyakrylamidové gely (tabulka 3.28 na straně 56) a vloženy do napětí 150 V po dobu 1 h. Z připraveného zásobního roztoku byly vždy připraveny dva totožné gely, které byly podrobeny elektroforéze za identických podmínek. Jeden z gelů byl následně barven klasickým způsobem, viz SDS-PAGE (postup stejný jako v kapitole 3.5.4), který vizualizuje proteiny. Druhý z gelů byl barven pomocí stříbra. Barvení stříbrem je možné použít i pro vizualizaci proteinů, v tomto případě však bylo použito pro vizualizaci DNA, která je citlivější. Proto bylo třeba včas zastavit reakci, při které se Ag^+ vázané na záporně nabitou fosfátovou kostru DNA redukují na kovové stříbro a vzniká typické černé zbarvení. Pokud by reakce nebyla zastavena včas, došlo by nejen k redukci Ag^+ vázaných na proteiny ale postupně i iontů volně se pohybujících v roztoku a experiment by nebylo možné smysluplně vyhodnotit.

Barvení proběhlo dle následujícího protokolu:

- 1) gel 15 min inkubovat za občasného lehkého promíchání v 75 ml 1% (v/v) HNO_3
- 2) slít, opláchnout gel destilovanou vodou a dalších 15 min inkubovat gel v 75 ml H_2O s 0,5 ml 30% (w/v) AgNO_3 za občasného lehkého promíchání
- 3) slít, opláchnout destilovanou vodou a za stálého míchání inkubovat v redukčním roztoku (tabulka 3.29) do vizualizace gelu, následně reakci ukončit zalitím 10% (v/v) CH_3COOH

Tabulka 3.27:

Barva pro EMSA:	10 ml
TBE pufr 10x	1 ml
bromfenolová modř	10 mg
glycerol	3 ml
doplnit na 10 ml deionizovanou vodou	

Tabulka 3.28:

Složení gelu pro EMSA	pipetovaný objem
TBE pufr 10x	1,2 ml
Rotiphorese Gel 30	6,8 ml
10% (w/v) APS	120 μl
deionizovaná voda	5,94 ml
TEMED	15 μl

Tabulka 3.29:

Redukční roztok:	
$\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	75 ml 3% (w/v) roztoku
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	6,6 μl 2,25% (w/v) roztoku
formaldehyd	37,5 μl

3.7 Molekulové dokování

Poslední částí této práce bylo provedení teoretických termodynamických výpočtů pomocí programu "AutoDock Vina"^[62]. Tento program dokáže pracovat s daty z databáze PDB a různých programů navrhujících nízkomolekulární struktury pomocí metod molekulové dynamiky. Je schopen vypočítat potenciální energii všech možných interakcí nízkomolekulární látky s makromolekulou proteinu a vyhodnotit, které z nich jsou energeticky nejvýhodnější. Data z PDB obsahují informaci o pozicích a interakcích atomů proteinu a primárního hydratačního obalu, data popisující nízkomolekulární ligand pak to samé pro něj. "AutoDock Vina" je schopen předpovědět s vysokou přesností jak bude vypadat vázaný stav nízkomolekulárního ligandu na základě těchto vstupních informací. Pomocí algoritmu popsaneho v článku^[63] je Vina schopna provést tento výpočet v reálném čase na běžně dostupném počítačovém vybavení.

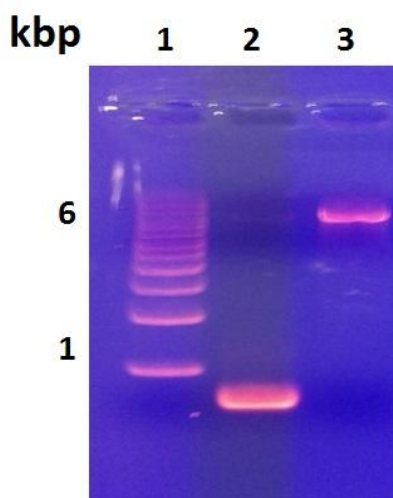
Data použitá pro tuto práci byla získána z databáze PDB, kde jsou uložena pod 2UZK (krystalová struktura) a 2K86 (NMR struktura). Cílem tohoto postupu bylo zjistit, zda teoretický výpočet bude odpovídat reálným výsledkům získaným z NMR spektroskopie. Energeticky nejvýhodnější uspořádání vazby inhibitoru S9 na FOXO3-DBD by mělo odpovídat experimentálním datům. Inhibitor S9 by měl být na protein navázán v místě DNA-vazebního povrchu nebo v jeho těsné blízkosti, aby překážel vazbě na DNA.

Výstupem je soubor PDBQT, který je možné vizualizovat například v programu "PyMOL". Ten nese strukturní informaci o makromolekule a zvoleném počtu energeticky nejvýhodnějších pozic inhibitoru ve vázaném stavu.

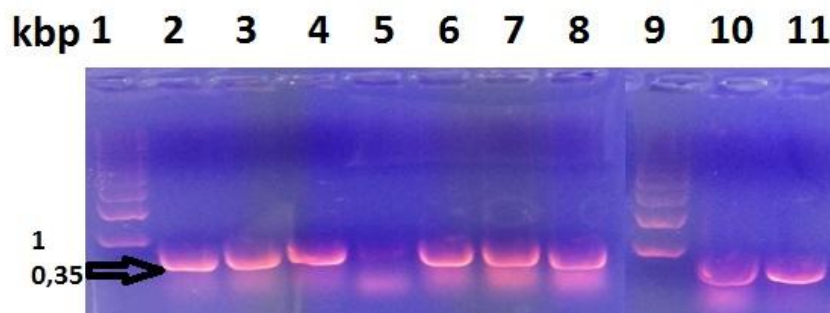
4 VÝSLEDKY

4.1 Příprava expresního konstruktu

Komplementární DNA (cDNA) FOXO3-DBD byla připravena prostřednictvím polymerasové řetězové reakce. Pro reakci byl jako templát použit rekombinantní gen pro FOXO3 v plasmidu pGEX 4-P-1 a syntetické oligonukleotidy navržené pro vnesení cDNA do plasmidu pET-15b. Průběh PCR byl monitorován pomocí horizontální agarosové elektroforézy. Následně byl vektor pET15b i FOXO3-DBD štěpen endonukleasami BamHI a NdeI. Pro přečištění rozštěpeného FOXO3 a pET15b byl použit PCR Clean-Up Kit (Sigma Aldrich). Před ligací byly vzorky zkontrolovány pomocí agarové elektroforézy (70 V, 1 h, obrázek 4.1). Vzorky pro elektroforézu byly připraveny smísením 5 μ l DNA a 1 μ l barvy Loading Dye. Následovala transformace 3 μ l ligační směsi do 30 μ l TOP10 buněk. Správný průběh ligace byl zkontrolován provedením PCR kolonií (z angl. colony PCR). Výsledky byly opět vizualizovány pomocí agarové elektroforézy (70 V, 1 h, obrázek 4.2 na straně 59).



Obr. 4.1: 1% agarosový gel se vzorky použitými pro ligaci. V prvním sloupci je molekulový standard, ve druhém produkt PCR reakce a ve třetím přečištěný a linearizovaný plasmid. Vizualizováno pomocí GelRED barvy a UV záření.



Obr. 4.2: 1% agarosový gel obsahující vzorky z PCR kolonií. V prvním a devátém sloupci je molekulový standard, ve zbylých sloupcích je produkt PCR kolonií. Při této metodě dochází k polymerasové reakci s použitím oligonukleotidů komplementárních ke koncům úseku inserovaného genu. Z celého bakteriálního genomu obsaženého v reakční směsi se tedy amplifikuje pouze tento úsek (339 nukleotidů dlouhý).

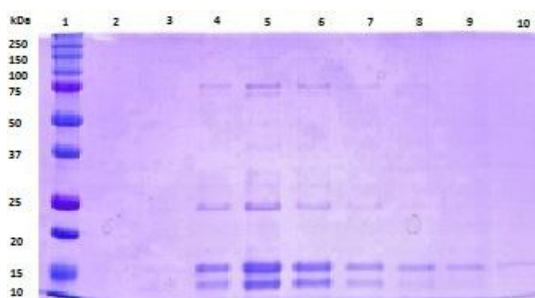
Vybrané kolonie byly odeslány do servisního pracoviště na sekvenaci, pomocí níž bylo ověřeno správnost vzniklého konstruktu. Vybrané vzorky pak byly využity k tvorbě glycerolové konzervy. Z této konzervy vycházely dále popsané purifikace.

4.2 Purifikace různých konstruktů FOXO3-DBD

Pro všechny purifikační kroky byl použit protokol vytvořený během mé bakalářské práce. Růst bakterií probíhal při 37 °C, exprese pak při 30 °C. Byla indukována 0,5 ml IPTG. Narostlé kultury byly centrifugovány, resuspendovány v lyzačním pufru a sonikovány. Výsledky všech jednotlivých kroků byly kontrolovány pomocí SDS PAGE. Jako standard byl použit Precision Plus Protein Standard (Biorad) obsahující proteinové standardy o molekulové hmotnosti 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 a 10 kDa. Ionově výměnná a gelová permeační chromatografie byly prováděny za použití FPLC ÄKTA Prime (Amersham Biosciences). Všechny nové konstrukty (zde popsán pouze ten, který byl nakonec vhodný pro další práci) byly transformovány do kmene *E. coli* BL21(DE3) a byl proveden expresní test v 1 LB média. Finální konstrukt byl pak purifikován ze 3 l LB média pro všechny experimenty kromě NMR spektroskopie. Pro tu bylo potřeba připravit vzorek značený, a proto byl protein exprimován ve značeném minimálním médiu M9. Výtěžek proteinu exprimovaného v minimálním médiu je nižší a proto bylo použito 6 l M9 média pro každý NMR pokus.

4.2.1 Expresní test konstruktů FOXO3-DBD (156-269) v pET15b

Expresní test byl proveden v 1 l LB média, exprese byla indukována při optické densitě bakteriální kultury při 600 nm rovné 0,8. Po noční expresi byla kultura centrifugována (40min, 4 °C, 2600×g) a resuspendována v lyzačním pufru (tabulka 3.7 na straně 35). Buňky byly rozbity sonikací a zmražením a supernatant byl podroben niklové chelatační chromatografii. Z jednotlivých 1,5ml frakcí byly odebrány vzorky a vizualizovány pomocí SDS-PAGE. Jak je vidět na obrázku 4.3, C-konec proteinu je náchylný k proteolytické degradaci, pokud není chráněn spojovací sekvencí a histidinovou kotvou. Ke všem vzorkům je před sonikací přidáván koktejl inhibitorů proteas, ale v tomto případě ani ten nebyl schopen dostatečně snížit aktivitu proteas ve vzorku obsažených. Z tohoto důvodu nebyl tento konstrukt používán pro další experimenty.

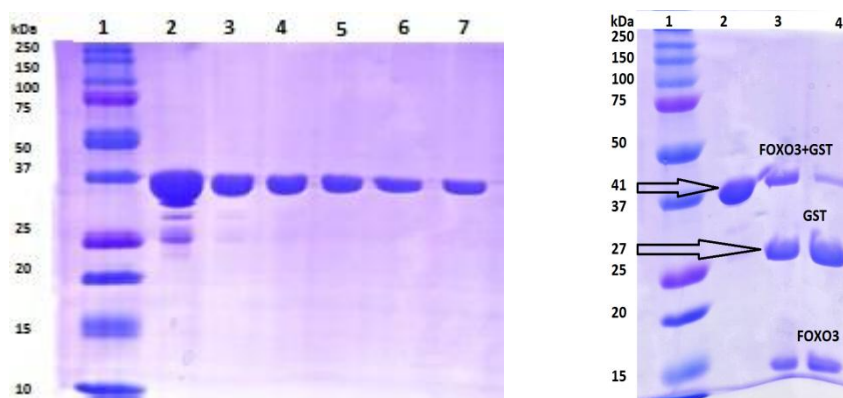


Obr. 4.3: 15 % (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE. Výsledek expresního testu FOXO3-DBD v pET15b. První dráha obsahuje standard molekulových vah a v ostatních jsou frakce 1-9 eluované z kolony pro niklovou chelatační chromatografii. Pruhy odpovídající hmotnosti přibližně 15 kDa náleží FOXO3-DBD. Pruhy odpovídající hmotnosti přibližně 10 kDa jsou pak degradační produkty vzniklé proteolýzou FOXO3-DBD od nechráněného C-konce. Ostatní pruhy o vyšších molekulových hmotnostech náleží nečistotám, které se odstraňují v dalších krocích purifikace.

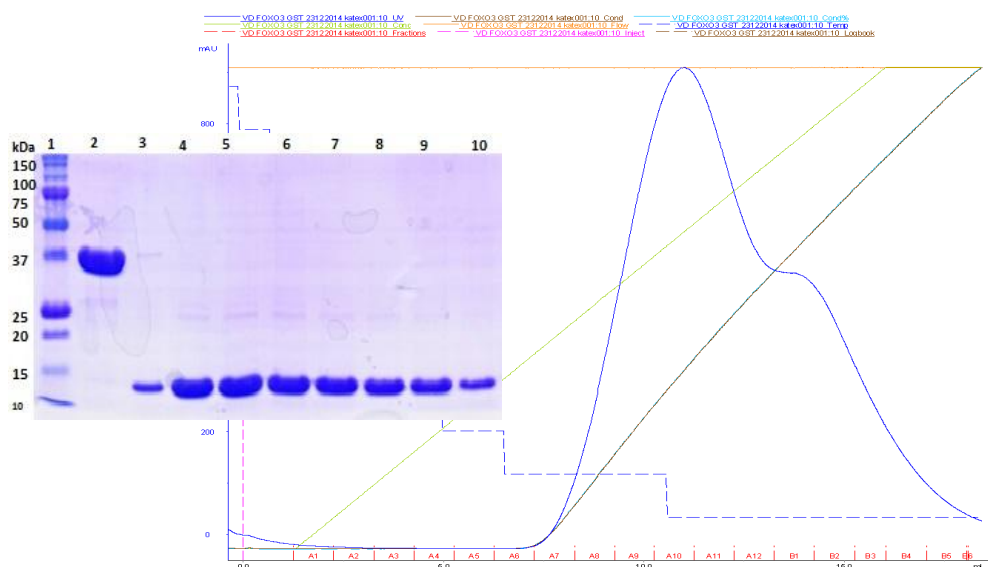
4.2.2 Purifikace FOXO3-DBD (156-269) pGEX-6-P-1

Po standardní expresi následovala purifikace konstruktů FOXO3-DBD ve vektoru pGEX-6-p1. Místo niklové chelatační chromatografie byla však použita GST afinitní chromatografie. Poté byla, během dialýzy, odštěpena GST kotva pomocí PreScission Protease (obrázek 4.4 na straně 61). Následovala kationtově výměnná chromatografie, při které se oddělily obě části rozštěpeného fúzního proteinu (obrázek 4.5 na straně 61). Nakonec byl vzorek proteinu koncentrován na přibližně 0,5 ml a podroben gelové permeační chromatografii, aby došlo k odstranění zbylých nečistot a

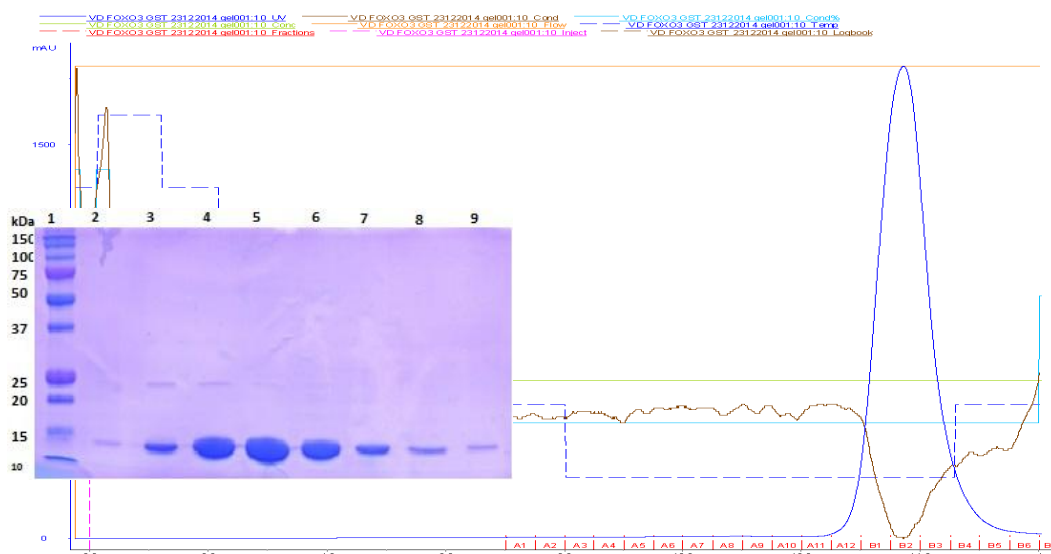
proteinových agregátů (obrázek 4.6 na straně 62). Bylo získáno 6,2 mg proteinu o koncentraci 2,5 mg/ml (167 μ M). Tento protein byl použit pro dále popsané experimenty.



Obr. 4.4: 15 % (v/v) polyakrylamidové gely z SDS-PAGE. Gel vlevo obsahuje v první dráze standard molekulových vah a ve všech ostatních eluát z kolony pro GST afinitní chromatografii obsahující fúzní protein FOXO3-DBD-GST. Na gelu vpravo je v prvním sloupci opět standard molekulových vah, ve druhém pak vzorek před proteolytickým štěpením (opět eluát jako na gelu vpravo), ve třetím a čtvrtém pak jsou výsledky proteolytického štěpení během dialýzy v jedné, respektive druhé dialyzační membráně. Je vidět, že proteolýza neproběhla dokonale a část fúzního proteinu zůstala nerozštěpena (pruh u 37 kDa). Většina proteinu však byla rozštěpena na GST (pruh u 25 kDa) a FOXO3-DBD (pruh u 15 kDa).



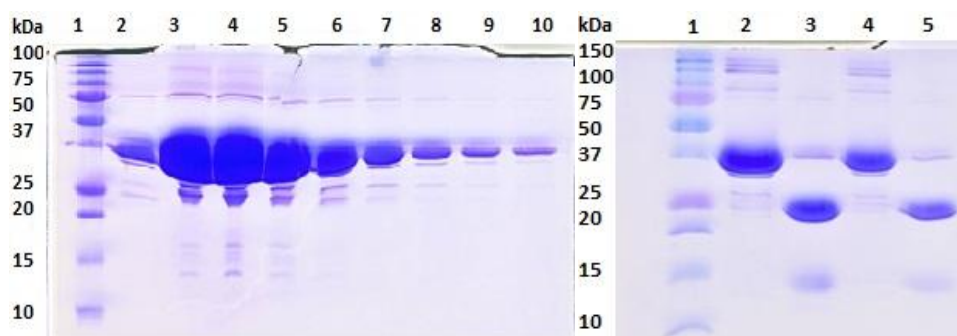
Obr. 4.5: Profil z kationtově výměnné chromatografie. 15 % (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE zobrazuje v první dráze vzorek před štěpením a v ostatních eluát z kolony v pořadí A8, A9, A10, A11, A12, B1, B2 a B3 ve sloupcích 3-10. V prvním sloupci je standard molekulových vah. V pozadí je spektrofotometrický profil měření.



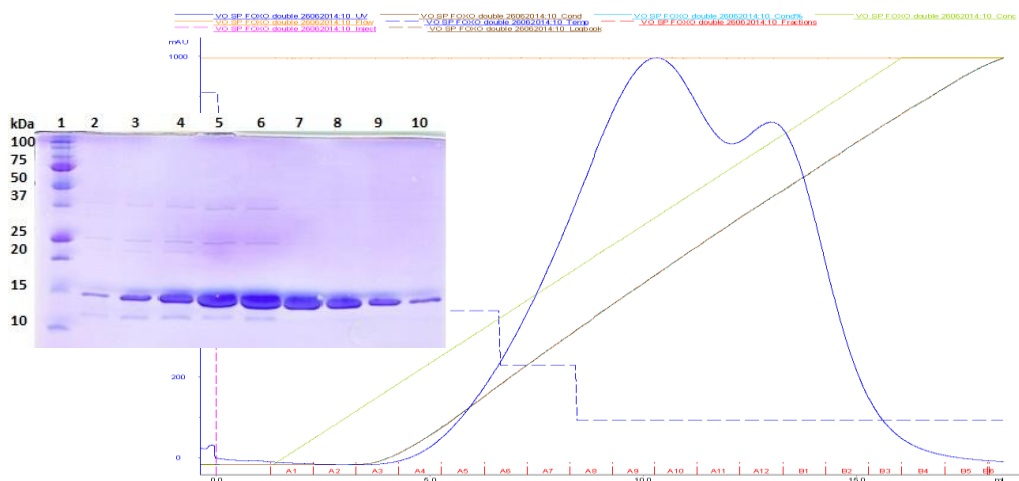
Obr. 4.6: Profil z gelové permeační chromatografie. 15 % (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE zobrazuje frakce A11, A12, B1, B2, B3, B4, B5 a B6 v tomto pořadí ve sloupcích 2-9. V prvním sloupci je standart molekulových vah. V pozadí je spektrofotometrický profil měření. Na gelu je vidět, že FOXO3-DBD (pruh u 15 kDa) má požadovanou čistotu a vzorek neobsahuje agregáty ani jiné nečistoty.

4.2.4 Purifikace ^{15}N a ^{13}C značené FOXO3-DBD

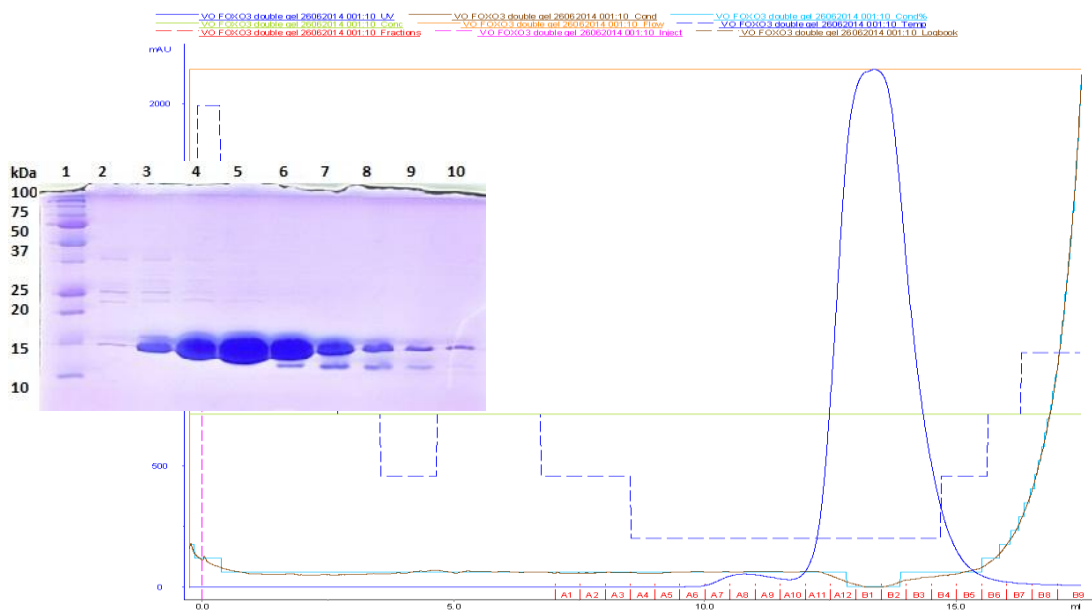
Posledním purifikačním krokem byla příprava ^{13}C a ^{15}N značeného proteinu pro pokročilé NMR experimenty pro strukturní studie. Byly použity 3 l minimálního M9 média. Postup byl stejný jako při purifikaci jednou značeného proteinu (obrázky 4.7-4.9 na stranách 59 a 60). Bylo získáno 12,9 mg proteinu o koncentraci 2,9 mg/ml (194 μM). Vzorek byl zamražen v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obr. 4.7: 15 % (v/v) polyakrylamidové gely z SDS-PAGE. Gel vlevo obsahuje v první dráze standard molekulových vah a ve všech ostatních eluát z kolony pro niklovou chelatační chromatografii obsahující fúzní protein FOXO3-DBD-GST. Na gelu vpravo je v prvním sloupci opět standard molekulových vah, ve druhém a čtvrtém pak vzorek před proteolytickým štěpením (opět eluát jako na gelu vpravo), ve třetím a pátém jsou pak výsledky proteolytického štěpení během dialýzy v jedné, respektive druhé dialyzační membráně. Většina proteinu byla rozštěpena na GST (pruh u 25 kDa) a FOXO3-DBD (pruh u 15 kDa).



Obr. 4.8: Profil z kationtové výměnné chromatografie. 15 % (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE zobrazuje v první dráze vzorek před štěpením a v ostatních eluát z kolony v pořadí A7, A8, A9, A10, A11, A12, B1, B2 a B3 ve sloupcích 2-10. V prvním sloupci je standard molekulových vah. V pozadí je spektrofotometrický profil měření.



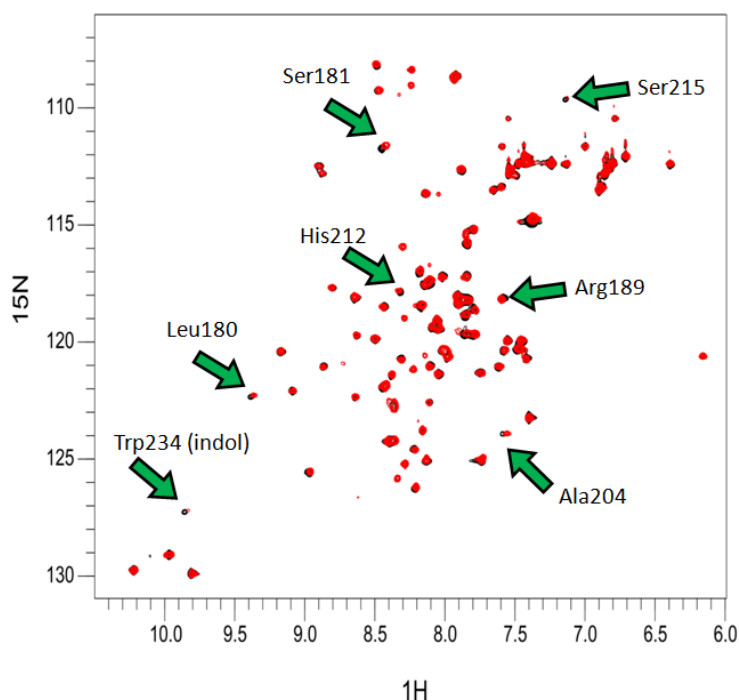
Obr. 4.9: Profil z gelové permeační chromatografie. 15 % (v/v) polyakrylamidový gel z SDS PAGE zobrazuje frakce A10, A11, A12, B1, B2, B3, B4, B5 a B6 v tomto pořadí ve sloupcích 2-10. V prvním sloupci je standart molekulových vah. V pozadí je spektrofotometrický profil měření. Na gelu je vidět, že FOXO3-DBD (pruh u 15 kDa) má požadovanou čistotu a vzorek obsahuje minimum agregátů a jiných nečistot.

4.3 Nukleární magnetická rezonance

Cílem experimentů využívajících NMR spektrometrii bylo dokázat a změřit interakci nízkomolekulárního inhibitoru S9 s FOXO-DBD. Připravené značené vzorky proteinu byly změřeny samostatně i v přítomnosti inhibitoru. Porovnáním změřených spekter pak bylo možné určit, které aminokyseliny se účastní vazby na protein. Následovalo přiřazení signálů v NMR spektru k jednotlivým aminokyselinám, a proto bylo nakonec nutné přistoupit k přípravě dvojité značeného proteinu a přiřadit signály vlastnoručně.

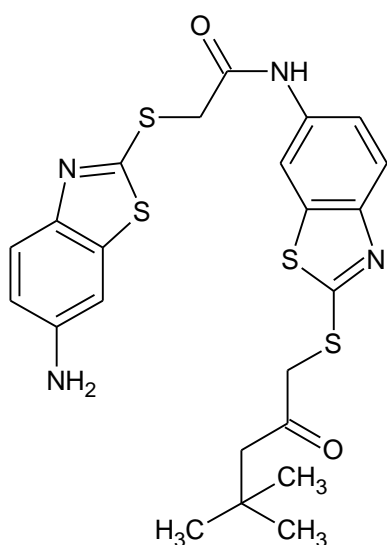
4.3.1 HSQC spektrum FOXO3-DBD v přítomnosti inhibitoru S9

Před měřením NMR byl vzorek dialyzován do čerstvého fosfátového pufru k odstranění glycerolu. Finalní objem jednotlivých vzorků byl 700 μ l. Koncentrace těchto vzorků byla 213 μ M u 15 N značeného vzorku, respektive 186 μ M u 15 N a 13 C značeného vzorku. Vzorky byly připravovány jako 500 μ M a 2mM roztok inhibitoru S9, z důvodu jeho omezené rozpustnosti však nelze přesně určit jeho skutečnou koncentraci v roztoku. Agregace inhibitoru S9 byla pozorována při překročení 1mM koncentrace.



Obr. 4.10: HSQC spektrum 15 N značeného FOXO3-DBD korelující 1 H s 15 N. Černě jsou znázorněny krospektry spektra FOXO3-DBD, červeně krospektry spektra FOXO3-DBD v přítomnosti inhibitoru S9. Porovnáním detailů spektra je možné určit rozdíly (na obrázku znázorněny šipkami) a určit, které aminokyseliny se účastní vazby na inhibitor. (Leu180, Ser 181, Arg189, Ala204, His212, Ser215 a Trp234) Osa x znázorňuje chemické posuny vodíku, osa y pak dusíku, všechny v ppm.

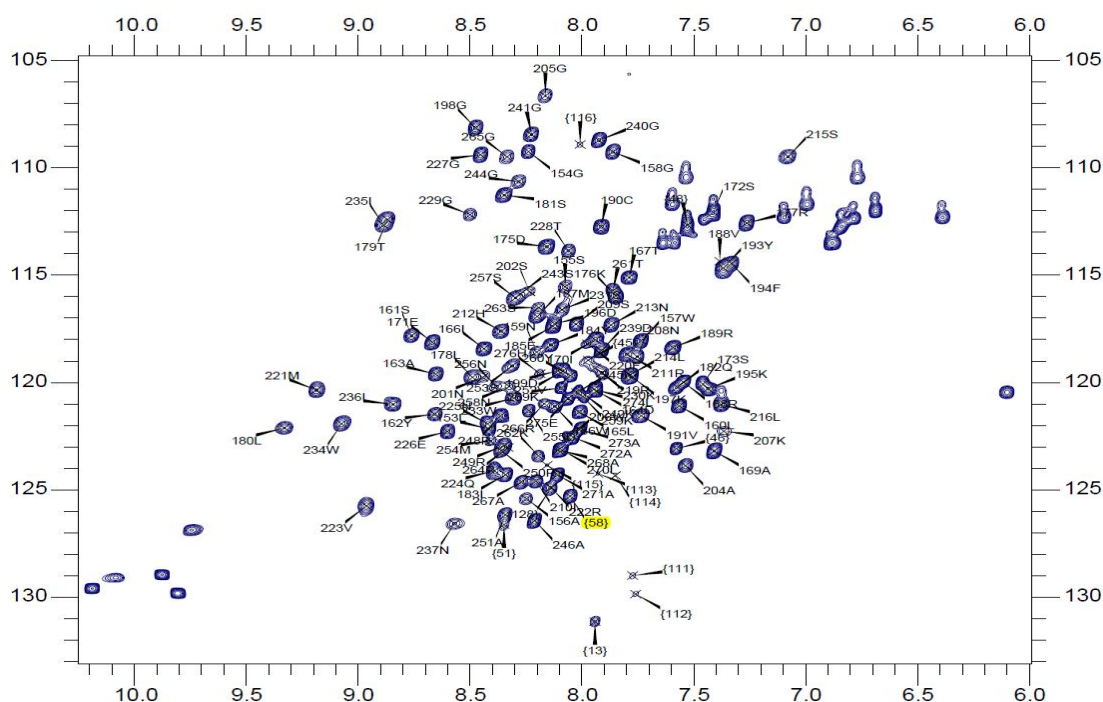
Jak je vidět na obrázku 4.10 (strana 64), došlo přidáním inhibitoru ke změně chemických posunů Leu180, Ser 181, Arg189, Ala204, His212, Ser215 a Trp234. Problémem tohoto přiřazení signálů podle spektra publikovaného v literatuře byl C-konec používaného proteinu, který se lišil od toho publikovaného. Nebylo tedy možné přiřadit několik aminokyselin. Jedna z těchto aminokyselin vykazovala změny chemického posunu v přítomnosti inhibitoru S9 (struktura na obrázku 4.11). Pro zjištění této informace bylo nutné připravit dvojité značený protein a celý proces přiřazování signálů jednotlivým aminokyselinám projít od začátku.



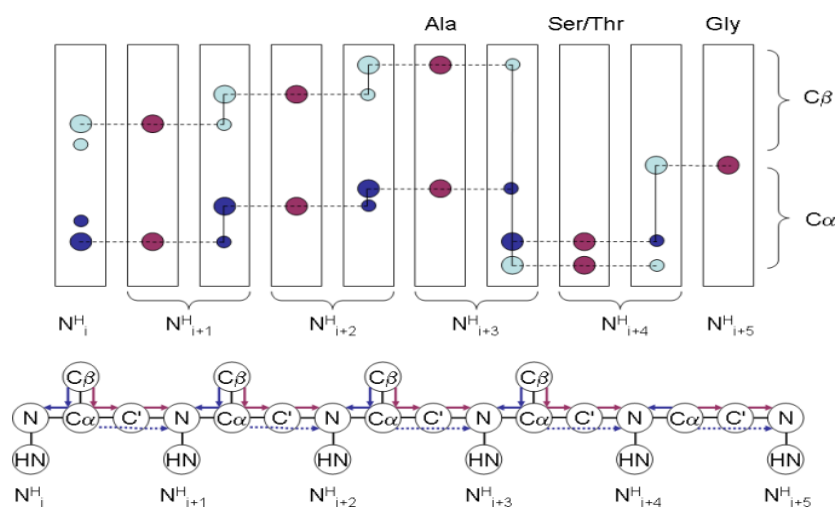
Obr. 4.11: Chemický vzorec použitého inhibitoru S9. Tato práce se zabývá převážně inhibitorem S9, který ze zkoumané sady vykazuje největší biologickou aktivitu. Celá sada byla získána od dr. Ausserlechnera (Medizinische Universität Innsbruck, Rakousko). Vytvořeno pomocí programu "Chemsketch"^[64].

4.3.2 Sekvenční přiřazení aminokyselin za použití ^{15}N a ^{13}C značeného proteinu

Na základě spektra ^{13}C a ^{15}N značeného proteinu bylo možné určit, které aminokyseliny se účastní vazby na inhibitor. Jednotlivé krosípky byly přiřazeny k aminokyselinám primární sekvence (obrázek 4.12, strana 63) pomocí postupu popsáného v textu a znázorněného na obrázku 4.13 na straně 63. Jeden ze signálů však patřil jednomu z histidinů (na obrázku 4.13 vyznačena žlutě {58}) z histidinové kotvy a jednalo se tedy o artefakt.



Obr. 4.12: HSQC spektrum ^{15}N značeného FOXO3-DBD korelující ^1H s ^{15}N . U všech krospliků, u kterých to bylo možné, jsou určeny náležící aminokyseliny s jejich pořadovým číslem v primární struktuře FOXO3-DBD. Žlutě je vyznačena aminokyselina {58}, která není ve spektru Wang et al.^[20] a která se účastní vazby na inhibitor. Osa x znázorňuje chemické posuny vodíku, osa y pak dusíku, všechny v ppm.

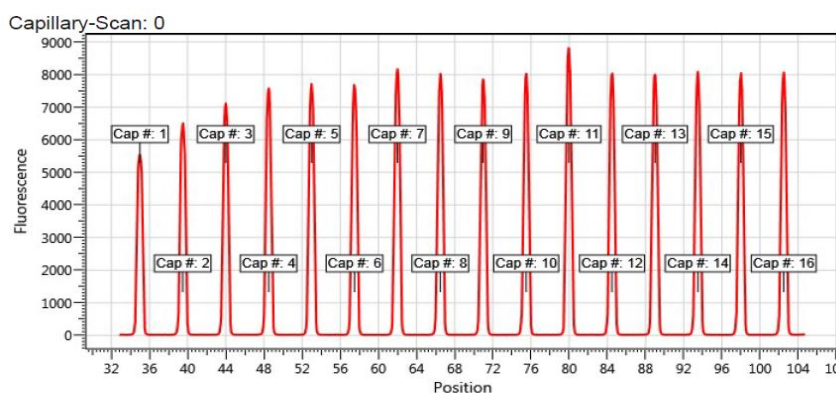


Obr. 4.13: Postup sekvenčního přiřazení krospliků ve spektru k jednotlivým aminokyselinám. Ve dvou znázorněných typech spekter jsou krospliky náležící aminokyselině i , respektive i a $i-1$. Některé aminokyseliny, např. Gly, mají typický chemický posun a jsou jednoduše určitelné jako startovní body. Na základě znalosti primární struktury proteinu je možné systematicky porovnávat spektra a přiřazovat jednotlivé signály k aminokyselinám. Obrázek převzat a upraven z Protein NMR^[65].

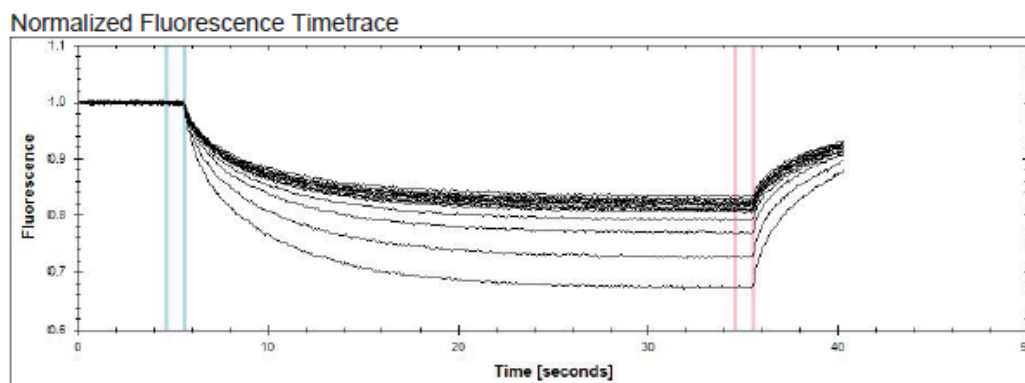
4.4 Stanovení vazebné afinity FOXO3-DBD pro inhibitor S9 pomocí mikrotermoforézy

Vzhledem k omezené rozpustnosti studovaných inhibitorů byla vazebná afinita FOXO3-DBD měřena pouze pro inhibitor S9, který byl rozpustný do koncentrace 1mM. Ke stanovení vazebné afinity (K_D) byla použita mikrotermoforéza. Tato metoda byla zvolena proto, že není tolik závislá na obsahu DMSO v měřených roztocích jako jiné, alternativní metody zjišťování K_D (kalorimetrie, plasmonová rezonance).

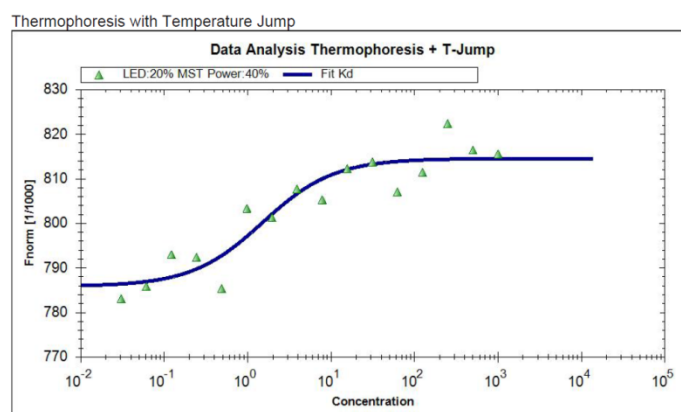
Výsledkem termoforetických měření je série vazebných křivek, ze kterých operační software přístroje rovnou určuje disociační konstantu FOXO3-DBD a jednotlivých inhibitorů. Na obrázku 4.15 je znázorněn výsledek kapilárního skenu, který přístroj automaticky provádí, aby určil vhodnou intenzitu používaného laseru. Na obrázku 4.16 (na straně 65) ukazuje časový průběh fluorescence v jednotlivých fázích pokusu. Na obrázku 4.17 (strana 65) je znázorněna vazebná křivka pro interakci inhibitoru S9 s FOXO3-DBD. Z křivky proložené experimentálními hodnotami byla určena hodnota $K_D = 1,5 \pm 0,2 \mu\text{M}$.



Obr. 4.15: Graf znázorňující průběh průzkumu kapilár FOXO3. Osa x označuje relativní fluorescenci, osa y pak pozici kapiláry v dokovacím zařízení přístroje. Tímto způsobem si přístroj mapuje pozice vzorků a zaměřuje excitační laser. Zároveň dochází ke změření fluorescence vzorků a určení intenzity použitého laseru. Fluorescence nesmí přesáhnout detekční limit přístroje a zároveň musí všechny kapiláry poskytovat obdobný signál (absolutní fluorescence je přepočítána podle koncentrace konkrétního vzorku). Pokud je rozdíl fluorescence kapilár příliš velký (v závislosti na použitých podmínkách je přípustný rozdíl až 20%), je třeba použít jiný typ kapilár a přesněji připravovat vzorky.



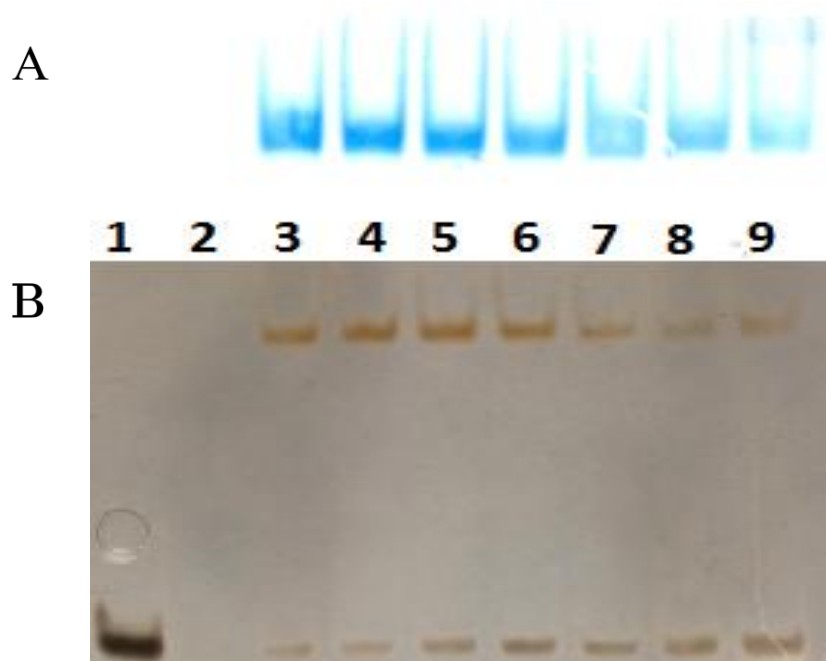
Obr. 4.16: *Graf závislosti fluorescence vzorku v průběhu měření na čase. Na obrázku jsou křivky všech kapilár v jednom grafu. První část grafu, před modrou čarou, ukazuje fluorescence vzorku v klidu. V tomto bodě je také změřena (oblast mezi dvěma modrými čarami). Po druhé modré čáře následuje zapnutí laseru a lokální ohřátí vzorku, takzvaný teplotní skok (z anglického T-jump). Na konci tohoto procesu, těsně před vypnutím laseru, je změřena finální hodnota fluorescence (oblast mezi dvěma červenými čarami). Nakonec následuje návrat do tepelné rovnováhy po vypnutí laseru a postupný nárůst fluorescence na původní úroveň (oblast za druhou červenou čarou, snímání vzorku bylo ukončeno před opětovným dosažením rovnováhy).*



Obr. 4.17: *Vazebná křivka FOXO3-DBD a inhibitoru S9. FOXO3-DBD bylo značeno fluorescenční barvou NT-647-HNS. Ve všech měřených vzorcích byla koncentrace proteinu 100nM a koncentrace inhibitoru S9 rostla dvojkovou řadou od 0,03 do 1000 μ M. Zelené trojúhelníky znázorňují experimentální data, modrá křivka pak vypočtenou vazebnou křivku, ze které byla vypočtena $K_D = 1,5 \pm 0,2 \mu$ M.*

4.5 Ověření inhibice vazby FOXO3-DBD na DNA v přítomnosti inhibitoru S9 pomocí nativní elektroforézy

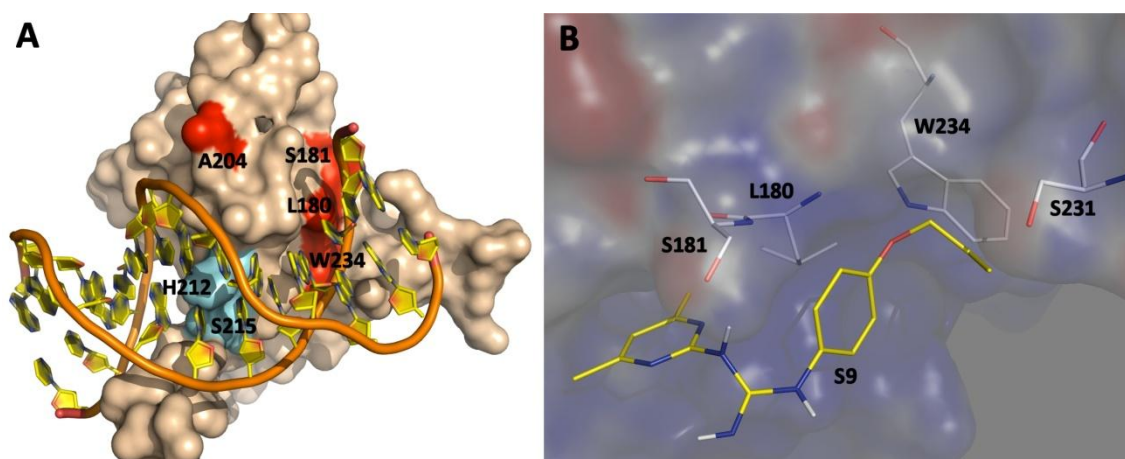
Ověření inhibice vazby FOXO3-DBD na DNA v přítomnosti S9 bylo provedeno pomocí nativní elektroforézy. Ostatní inhibitory nebyly testovány vzhledem k jejich omezené rozpustnosti. Na gelu barveném pomocí Coomassie Blue (obrázek 4.18A, strana 67) je vizualizována pouze FOXO3-DBD v komplexu s DNA. Na stříbrem barveném gelu (je vizualizována pouze DNA - obrázek 4.18B, strana 67) je v horní části detekována DNA v komplexu s FOXO3-DBD. Volná DNA vykazuje mnohem vyšší pohyblivost než komplex protein-DNA a je proto detekována v dolní části gelu. Dráha číslo jedna obsahovala pouze DNA, dráha číslo dvě pouze FOXO3-DBD. V použitém pufru s pH=8 má FOXO3-DBD kladný náboj (pI=11,37) a při použitém zapojení elektroforézy nevstupuje do gelu. Z tohoto důvodu není v druhé dráze nic detekováno. Dráha tři obsahovala komplex DNA s FOXO3-DBD v nepřítomnosti S9. Dráhy 4-9 obsahovaly směs DNA s FOXO-DBD v přítomnosti inhibitoru S9 o stoupající koncentraci (25, 50, 75, 100, 150 a 200 μ M). Na gelu je vidět, že bez přítomnosti inhibitoru je většina DNA vázána v komplexu s proteinem. Jakmile se ve vzorku objeví inhibitor, koncentrace volné DNA roste, což koresponduje se zvyšující se intenzitou pruhu v dolní části gelu. Zároveň se snižuje intenzita pruhu odpovídajícího DNA v komplexu s FOXO3-DBD, protože tvorba tohoto komplexu je blokována inhibitorem S9.



Obr. 4.18: *Porovnání polyakrylamidových gelů barvených (A) klasickým způsobem (nahore modře) a (B) pomocí stříbra (dole hnědočerně). V první dráze je samotná DNA, v druhé samotná FOXO3-DBD, ve třetí komplex DNA s FOXO3-DBD. Dráhy 4-9 pak ukazují rostoucí koncentraci inhibitoru S9 (25, 50, 75, 100, 150 a 200 μ M).*

4.8 Vizualizace vazby inhibitoru S9 na DNA-vazebný povrch FOXO3-DBD pomocí molekulárního dokování

S využitím dat z článku Wang et al.^[20] a jejich publikované struktury bylo možné v programu "PyMOL" vizualizovat FOXO3-DBD a barevně vyznačit aminokyseliny účastnící se interakce s inhibitorem S9. Jedná se o aminokyseliny Leu180, Ser181, Ala204, His212, Ser215, Ser231 a Trp234. Jak je vidět na obrázku 4.19A (strana 68), některé z nich opravdu tvoří v DNA-vazebný povrch proteinu. Toto pozorování podporuje myšlenku, že by tento inhibitor opravdu mohl být použit k blokování vazby proteinu na DNA (obrázek 4.19, strana 68).



Obr. 4.19: Vizualizace vazby inhibitoru S9 na DNA-vazebný povrch FOXO3-DBD. (A) Krystalová struktura FOXO3-DBD vázaná k cílové DNA. Na základě NMR měření byly určeny aminokyselinové zbytky účastnící se vazby na inhibitor S9. V obrázku jsou vyznačeny červeně (vykazují v přítomnosti inhibitoru velkou změnu chemického posunu) a modře (vykazují mírnou změnu chemického posunu v přítomnosti inhibitoru). Jde o Leu180, Ser181, Ala204, His212, Ser215, Ser231 (není na obrázku, nachází se na odvrácené straně proteinu) a Trp234. Na obrázku je vidět, že tyto aminokyseliny se nachází v DNA-vazebném povrchu proteinu. (B) Výsledek molekulárního dokování inhibitoru S9. Pro výpočet byla použita struktura proteinu publikovaná Wangem et al. ^[20] (PDB kód 2K86). Vizualizováno v programu PyMOL^[37], vypočteno pomocí programu AutoDock Vina^[66,67].

5 DISKUZE

Cílem této práce bylo charakterizovat vazbu inhibitoru S9 na DNA-vazebnou doménu proteinu FOXO3. Inhibicí této vazby by bylo teoreticky možné blokovat fyziologickou funkci FOXO3 jako transkripčního faktoru. Toho by se dalo využít v některých typech rakovin, zejména dětského neuroblastomu, kde FOXO3 bylo popsáno jako zdroj zvýšené odolnosti rakovinných buněk vůči oxidačnímu stresu. Sada inhibitorů byla získána od spolupracující laboratoře dr. Ausserlechnera, kde se provádí testování na biologické úrovni. Cílem této spolupráce bylo podat komplexní vysvětlení mechanismu inhibice na molekulární i fyziologické úrovni. Všechny inhibitory byly uchovány ve formě zásobních roztoků v DMSO. Rozpustnost ve vodných pufrách byla však tak nízká, že nebylo možné změřit potřebná data použitím pouze jedné metody.

Aby to bylo možné, bylo třeba do pufrů přidávat DMSO, které ovšem destabilizuje protein samotný. I přesto, že je FOXO3-DBD odolný protein s dobrou stabilitou, nebylo možné používat vyšší koncentrace DMSO a očekávat, že zůstane v nativní konformaci. Sérií popsaných měření bylo sice dokázáno, že nativní struktura FOXO3-DBD je zachována ještě při 15% (v/v) obsahu DMSO (změřeno pomocí NMR spektroskopie), stabilita proteinu však byla snížena. Ve většině popsaných pokusů byla použita 10% (v/v) koncentrace DMSO, při které byl inhibitor S9 rozpustný natolik, že bylo možné použít klasické metody výzkumu. Situace však nebyla ideální ani pro protein samotný, ani pro inhibitory, jejichž koncentrace v takto zředěném roztoku DMSO nemohla být příliš vysoká. Nakonec se většina experimentů a celá tato práce zabývá pouze inhibitorem S9, který měl z celé sady nejlepší vlastnosti.

Pro následné biofyzikální měření byly exprimovány a purifikovány tři fúzní varianty (GST-FOXO3-His, His-FOXO3, GST-FOXO3). Byla změřena NMR spektra, ověřena stabilita proteinu a přiřazeny signály ve spektrech jednotlivým aminokyselinám. Po určení jednotlivých aminokyselin, u kterých dochází ke změnám chemického posunu, bylo jasné, že není možno používat aktuální konstrukt FOXO3-DBD k měření, protože jedna z námi určených aminokyselin byl histidin z histidinové kotvy, která u tohoto konstruktu nebyla odštěpitelná. Proto bylo přistoupeno k návrhu a přípravě nového expresního konstrukt (FOXO3 v pET15b), u kterého by byla tato histidinová kotva odštěpitelná. Tento konstrukt však podléhal proteolytické degradaci. Finální konstrukt použitý pro další pokusy obsahoval pouze odštěpitelnou

GST kotvu na N-konci. Výtěžky purifikace tohoto proteinu byly dobré a protein byl stabilní, proto mohl být použit pro další experimenty.

Následně byla změřena vazebná křivka pro interakci inhibitoru S9 s FOXO3-DBD a určena disociační konstanta pomocí mikrotermoforézy. Afinita inhibitoru byla nízká, pouze v mikromolární oblasti ($K_D = 1,5 \pm 0,2 \mu\text{M}$). Tomu nasvědčují i poměrně malé změny chemických posunů při NMR experimentech. Nicméně i přes nízkou vazebnou afinitu byla potvrzena schopnost inhibitoru S9 blokovat interakci mezi FOXO3-DBD a DNA pomocí nativní elektroforézy. Se stávající afinitou a omezenou rozpustností je použití v klinické praxi nemožné. V budoucnu bude nutné vyřešit problémy s rozpustností a pomocí racionálního návrhu zvýšit vazebnou afinitu. Tato práce také ukázala, že techniky NMR jsou vhodné pro sledování vazby těchto látek na FOXO3-DBD. Proteinová krystalografie nelze použít, protože FOXO-DBD je neuspořádaný protein krystalizující pouze v přítomnosti DNA. Z tohoto důvodu je NMR jediná použitelná metoda. Velkou komplikací byla i nutnost používat 10% DMSO pro zvýšení rozpustnosti látky, což znemožňovalo použití kalorimetrických metod. Nebylo totiž možné připravit roztok proteinu a roztok inhibitoru S9 o naprosto stejné koncentraci DMSO. Tyto rozdíly v koncentraci DMSO znemožnily efektivní měření tepelných změn doprovázejících vazbu inhibitoru na protein, protože rozpustné teplo DMSO je řádově přesahuje.

Hlavním výsledkem této práce jsou NMR spektra dokazující vazbu inhibitorů na FOXO3-DBD. Bylo experimentálně dokázáno, že inhibitory se na tento protein váží v místě jeho DNA-vazebného povrchu a mohou tedy blokovat vazbu na DNA. Tento předpoklad byl experimentálně potvrzen pomocí nativní elektroforézy. Dalším krokem v práci s těmito inhibitory by měla být derivatizace a zlepšení rozpustnosti.

6 ZÁVĚR

- 1) Byl připraven expresní konstrukt pro přípravu FOXO3-DBD pro NMR měření (sekvence na straně 34). Byl exprimován a purifikován protein FOXO3-DBD. Dále byl připraven ^{15}N a $^{15}\text{N} + ^{13}\text{C}$ isotopově značený protein FOXO3-DBD pro NMR měření.
- 2) Pomocí NMR spektroskopie byly identifikovány aminokyselinové zbytky FOXO3-DBD účastnící se vazby inhibitoru S9.
- 3) Pomocí mikrotermoforézy byla určena disociační konstanta vazby nízkomolekulárního inhibitoru S9 na FOXO3-DBD.
- 4) Pomocí nativní elektroforézy bylo prokázáno, že v přítomnosti nízkomolekulárního inhibitoru S9 dochází k zablokování vazby FOXO3-DBD na DNA.

7 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- 1 – Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L.: kapitola DNA, RNA and the Flow of Genetic Information v knize *Biochemistry*, W.H.Freeman and co., New York, str. 109-138 (2012)
- 2 – Mechanism of transcription, *PremedHQ*
čerpáno z <https://www.premedhq.com/mechanism-of-transcription> (27.1. 2016)
- 3 – Weigel, D., Jürgens, G., Küttner, F., Seifert, E., & Jäckle, H. (1989). The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the Drosophila embryo. *Cell*, 57(4), 645-658.
- 4 – Lee, H. H., & Frasch, M. (2004). Survey of forkhead domain encoding genes in the Drosophila genome: classification and embryonic expression patterns. *Developmental dynamics*, 229(2), 357-366.
- 5 – Burgering, B. T. (2008). A brief introduction to FOXOlogy. *Oncogene*, 27(16), 2258-2262.
- 6 – Kaestner, K. H., Knöchel, W., & Martínez, D. E. (2000). Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes & development*, 14(2), 142-146.
- 7 – Galili, N., Davis, R. J., Fredericks, W. J., Mukhopadhyay, S., Rauscher, F. J., Emanuel, B. S., Rovera, G., Barr, F. G. (1993). Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nature genetics*, 5(3), 230-235.
- 8 – Lam, E. F., Francis, R. E., & Petkovic, M. (2006). FOXO transcription factors: key regulators of cell fate. *Biochemical Society Transactions*, 34(5), 722-726.
- 9 – Tsai, K. L., Sun, Y. J., Huang, C. Y., Yang, J. Y., Hung, M. C., & Hsiao, C. D. (2007). Crystal structure of the human FOXO3a-DBD/DNA complex suggests the effects of post-translational modification. *Nucleic acids research*, 35(20), 6984-6994.
- 10 – Dobson, M., Ramakrishnan, G., Ma, S., Kaplun, L., Balan, V., Fridman, R., & Tzivion, G. (2011). Bimodal regulation of FoxO3 by AKT and 14-3-3. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(8), 1453-1464.
- 11 – Wilson, M. S. C., Lam, E. W.-F. (3.8. 2009) FoxO3. *Transcription factors encyclopedia*. čerpáno z <http://cisreg.cmmmt.ubc.ca/cgi-bin/tfe/articles.pl?tfid=478> (23.1. 2016)
- 12 – Accili, D., & Arden, K. C. (2004). FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*, 117(4), 421-426.
- 13 – Schmidt, M., de Mattos, S. F., van der Horst, A., Klompaker, R., Kops, G. J. L., Lam, E. W. F., Burgering, B. M. T., Medema, R. H. (2002). Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. *Molecular and cellular biology*, 22(22), 7842-7852.
- 14 – Evans-Anderson, H. J., Alfieri, C. M., & Yutzey, K. E. (2008). Regulation of cardiomyocyte proliferation and myocardial growth during development by FOXO transcription factors. *Circulation research*, 102(6), 686-694.
- 15 – Peng, S. L. (2008). Foxo in the immune system. *Oncogene*, 27(16), 2337-2344.
- 16 – van der Horst, A., & Burgering, B. M. (2007). Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(6), 440-450.
- 17 – Zhang, X., Tang, N., Hadden, T. J., & Rishi, A. K. (2011). Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(11), 1978-1986.
- 18 – Kops, G. J., Dansen, T. B., Polderman, P. E., Saarloos, I., Wirtz, K. W., Coffey, P. J., ... & Burgering, B. M. (2002). Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature*, 419(6904), 316-321.

- 19 – Kim, H. K., Kim, Y. K., Song, I. H., Baek, S. H., Lee, S. R., Kim, J. H., & Kim, J. R. (2005). Down-regulation of a forkhead transcription factor, FOXO3a, accelerates cellular senescence in human dermal fibroblasts. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 60(1), 4-9.
- 20 – Wang, F., Marshall, C. B., Yamamoto, K., Li, G. Y., Plevin, M. J., You, H., ... & Ikura, M. (2008). Biochemical and structural characterization of an intramolecular interaction in FOXO3a and its binding with p53. *Journal of molecular biology*, 384(3), 590-603.
- 21 – Kitamura, T., Nakae, J., Kitamura, Y., Kido, Y., Biggs, W. H., Wright, C. V., White, M. F., Arden, K. C., Accili, D. (2002). The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic β cell growth. *The Journal of clinical investigation*, 110(12), 1839-1847.
- 22 – de Brachène, A. C., & Demoulin, J. B. (2015). FOXO transcription factors in cancer development and therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1-14.
- 23 – Paik, J.-H. (2006). FOXOs in the maintenance of vascular homeostasis. *Biochemical society transactions*, 34(5), 731-734.
- 24 – Maiese, K., Chong, Z. Z., & Shang, Y. C. (2007). "Sly as a FOXO": new paths with Forkhead signaling in the brain. *Current neurovascular research*, 4(4), 295.
- 25 – Li, N., Luo, H., Liu, X., Ma, S., Lin, H., Chen, R., ... & Zhang, D. (2015). Association study of polymorphisms in FOXO3, AKT1 and IGF-2R genes with human longevity in a Han Chinese population. *Oncotarget*.
- 26 – van der Horst, A., & Burgering, B. M. (2007). Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(6), 440-450.
- 27 – Soerensen, M., Nygaard, M., Dato, S., Stevnsner, T., Bohr, V. A., Christensen, K., & Christiansen, L. (2015). Association study of FOXO3A SNPs and aging phenotypes in Danish oldest - old individuals. *Aging cell*, 14(1), 60-66.
- 28 – Jin, T. (2008). The WNT signalling pathway and diabetes mellitus. *Diabetologia*, 51(10), 1771-1780.
- 29 – Jacobs, F. M., van der Heide, L. P., Wijchers, P. J., Burbach, J. P. H., Hoekman, M. F., & Smidt, M. P. (2003). FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 35959-35967.
- 30 – Obsil, T., & Obsilova, V. (2011). Structural basis for DNA recognition by FOXO proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(11), 1946-1953.
- 31 – Eijkelenboom, A., Mokry, M., de Wit, E., Smits, L. M., Polderman, P. E., van Triest, M. H., van Boxtel, R., Schulze, A., de Laat, W., Cuppen, E., Burgering, B. M. (2013). Genome - wide analysis of FOXO3 mediated transcription regulation through RNA polymerase II profiling. *Molecular systems biology*, 9(1), 638.
- 32 – Obsil, T., Ghirlando, R., Anderson, D. E., Hickman, A. B., & Dyda, F. (2003). Two 14-3-3 binding motifs are required for stable association of Forkhead transcription factor FOXO4 with 14-3-3 proteins and inhibition of DNA binding. *Biochemistry*, 42(51), 15264-15272.
- 33 – Tzivion, G., Dobson, M., & Ramakrishnan, G. (2011). FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(11), 1938-1945.
- 34 – Van Der Heide, L. P., Hoekman, M. F., & Smidt, M. P. (2004). The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochemical Journal*, 380(2), 297-309.
- 35 – Calnan, D. R., & Brunet, A. (2008). The foxo code. *Oncogene*, 27(16), 2276-2288.
- 36 – databáze PDB (Protein Data Bank), <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

37 – program PyMOL, <http://www.pymol.org>

38 – Datta, S. R., Brunet, A., & Greenberg, M. E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & development*, 13(22), 2905-2927.

39 – Nicholson, K. M., & Anderson, N. G. (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular signalling*, 14(5), 381-395.

40 – Testa, J. R., & Bellacosa, A. (2001). AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 10983-10985.

41 – Carnero, A., & Paramio, J. M. (2014). The PTEN/PI3K/AKT pathway in vivo, cancer mouse models. *Front Oncol*, 4, 252.

42 – Huang, H., & Tindall, D. J. (2007). Dynamic FoxO transcription factors. *Journal of cell science*, 120(15), 2479-2487.

43 – Storz, P., Döppler, H., Copland, J. A., Simpson, K. J., & Toker, A. (2009). FOXO3a promotes tumor cell invasion through the induction of matrix metalloproteinases. *Molecular and cellular biology*, 29(18), 4906-4917.

44 – Bakker, W. J., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2007). FOXO3a is activated in response to hypoxic stress and inhibits HIF1-induced apoptosis via regulation of CITED2. *Molecular cell*, 28(6), 941-953.

45 – Naka, K., Hoshii, T., & Hirao, A. (2010). Novel therapeutic approach to eradicate tyrosine kinase inhibitor resistant chronic myeloid leukemia stem cells. *Cancer science*, 101(7), 1577-1581.

46 – Maris, J. M. (2010). Recent advances in neuroblastoma. *New England Journal of Medicine*, 362(23), 2202-2211.

47 – Bown, N. P., Pearson, A. D. J., & Reid, M. M. (1993). High incidence of constitutional balanced translocations in neuroblastoma. *Cancer genetics and cytogenetics*, 69(2), 166-167.

48 – Louis, C. U., & Shohet, J. M. (2015). Neuroblastoma: molecular pathogenesis and therapy. *Annual review of medicine*, 66, 49.

49 – Brodeur, G. M. (2003). Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature Reviews Cancer*, 3(3), 203-216.

50 – Robbins, H. L., & Hague, A. (2015). The PI3K/Akt pathway in tumors of endocrine tissues. *Frontiers in endocrinology*, 6.

51 – Sartelet, H., Rougemont, A. L., Fabre, M., Castaing, M., Duval, M., Fetni, R., Michiels, S., Beaunoyer, M., Vassal, G. (2011). Activation of the phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT pathway in neuroblastoma and its regulation by thioredoxin 1. *Human pathology*, 42(11), 1727-1739.

52 – Opel, D., Poremba, C., Simon, T., Debatin, K. M., & Fulda, S. (2007). Activation of Akt predicts poor outcome in neuroblastoma. *Cancer research*, 67(2), 735-745.

53 – Geiger, K., Hagenbuchner, J., Rupp, M., Fiegl, H., Sergi, C., Meister, B., Kiechl-Kohlendorfer, U., Müller, T., Ausserlechner, M. J., Obexer, P. (2012). FOXO3/FKHRL1 is activated by 5-aza-2-deoxycytidine and induces silenced caspase-8 in neuroblastoma. *Molecular biology of the cell*, 23(11), 2226-2234.

54 – plasmidová databáze Addgene
čerpáno z <https://www.addgene.org/> (10.4.2016)

55 – program CCPNMR Analysis, <http://www.ccpn.ac.uk/software/analysis>

56 – program Sparky, <https://www.cgl.ucsf.edu/home/sparky/>

57 – Wienken, C. J., Baaske, P., Rothbauer, U., Braun, D., & Duhr, S. (2010). Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nature communications*, 1, 100.

- 58 – Seidel, S. A., Wienken, C. J., Geissler, S., Jerabek - Willemsen, M., Duhr, S., Reiter, A., Trauner, D., Braun, D., Baaske, P. (2012). Label - Free Microscale Thermophoresis Discriminates Sites and Affinity of Protein–Ligand Binding. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(42), 10656-10659.
- 59 – Seidel, S. A., Dijkman, P. M., Lea, W. A., van den Bogaart, G., Jerabek-Willemsen, M., Lazic, A., Joseph, J. S., Srinivasan, P., Baaske, P., Simeonov, A., Katritch, I., Melo, F. A., Ladbury, J. E., Schreiber, G., Watts, A., Braun, D., Duhr, S. (2013). Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. *Methods*, 59(3), 301-315.
- 60 – Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C. J., Braun, D., Baaske, P., & Duhr, S. (2011). Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay and drug development technologies*, 9(4), 342-353.
- 61 – Holden, N. S., & Tacon, C. E. (2011). Principles and problems of the electrophoretic mobility shift assay. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 63(1), 7-14.
- 62 – program AutoDock Vina, <http://vina.scripps.edu/>
- 63 – Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461.
- 64 – program ChemSketch, <http://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/>
- 65 – Higman, V. A. (4.2. 2016) A practical guide. *Protein NMR*
čerpáno z <http://www.protein-nmr.org.uk/> (18.2. 2016)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

[illegible]